ÖSSZEHASONLITÓ FEHÉRJEVIZSGÁLATOK EGÉSZSÉGES ÉS VIRUSOS SÁRGASÁGGAL FERTŐZÖTT CUKORRÉPÁNÁL.

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Somfalvy Endre

1964.

Növénynemesitési és Növénytermesztési Kutató Intézet
Sopronhorpács.

JATE KÖZPONTI KÖNYVTÁRA
Folyóiratok
Szeged

Diss. B 517

Jósef Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára
SZEGED

Tartalomjegyzék

Bevezetés 1

Tárgyalás

1. A vizsgálati anyag előkészitése 1o
2. Fehérjetartalom meghatározása 1o
3. Plazmafehérjék papirelektroforézise 11
4. A cukorrépalevél plazmafehérjéinek káliumfoszfátos frakcionálása 18
5. Viruskimutatási-, kolloidlabilitási- és fehérjekicsapási-reakciók 24
6. Diagnosztikai immunsavó előállitása és in vitro vizsgálata 33
7. Összefoglalás 55

Kisérleti rész 58

Irodalom 68

Bevezetés.

A cukorrépalevél vizsgálata kémiai és biokémiai szempontból fontos, mert míg a gyökér kémiai összetevőivel, azok megoszlásával és elhelyezkedésével számos könyv és dolgozat foglalkozik, addig a levél vizsgálatával viszonylag kevesen foglalkoztak.

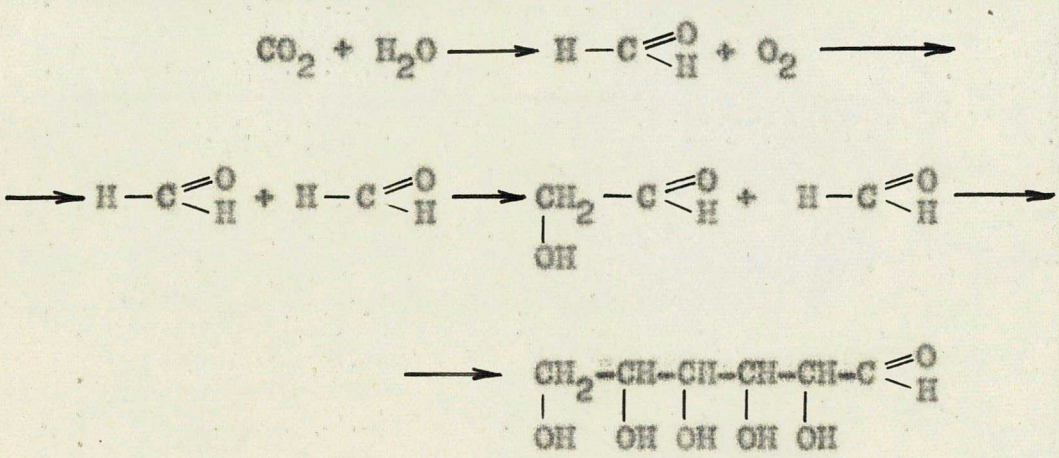
A levélnek, mint asszimiláló szervnek a vizsgálata számos uj kutatási lehetőséget nyujt, már csak azért is, mert a répa egyes betegségeinek tünetei a levélen jelentkeznek.

A répa a Földközi-tenger mellékéről származó növény. Nemesitett kulturváltozata a cukorrépa /Beta vulgaris var.saccharifera Alef./. A haploid sejtek kromoszómaszáma 9.

A növények széndioxidból és vizből a napfény energiájának felhasználásával - a fotoszintézis folyamatán keresztül - szerves anyagokat épitenek fel. A folyamat során a napfény hatására aktiválódott klorofillból felszabaduló kémiai energia végzi a bonyolultabb vegyületek szintézisét. Holländer /19/ szerint a fotoszintézisben minden természetes szinezék részt vesz, mely az elnyelt fényenergiát a klorofillnak át tudja adni. A fotoszintézis során képződött hexóz enzimatikus kondenzációval alakul át asszimilációs keményitővé. A vizben oldhatatlan asszimilációs keményitőszemcsék éjjel enzimatikusan depolimerizálódva glukózfoszfát /vagy foszfátok/ alakjában vándorolnak abba a növényi részbe, ahol a további szintézisekhez felhasználódnak vagy elraktározódnak. A tartalék tápanyagok általában a gyökerekben halmozódnak fel. A répánál nemcsak a gyökérben, hanem a hajtás szöveteiben is végbemegy a tartaléktápanyagok raktározódása. Különösen sok keményitő halmozódik fel a virusos sárgasággal fertőzött cukorrépa leveleiben.

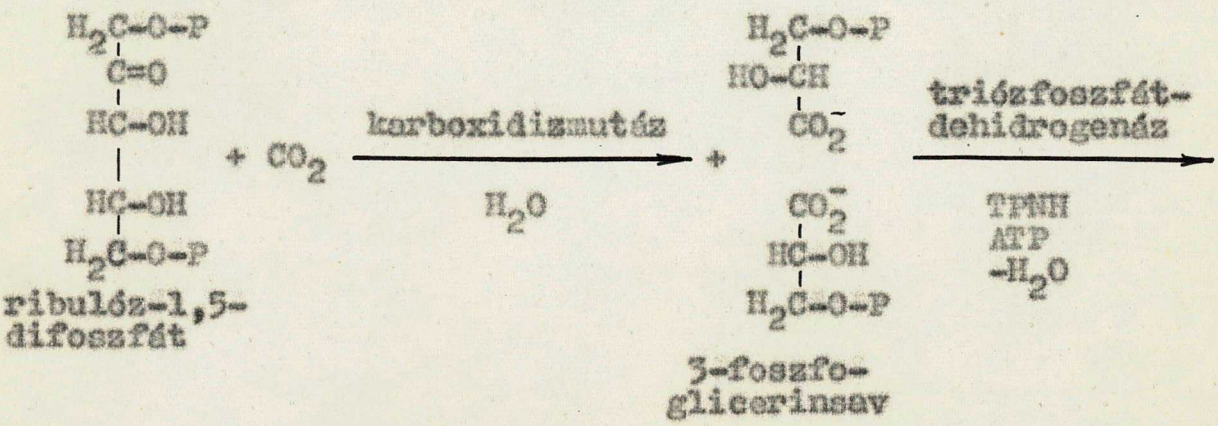
Asszimilálni csak a klorofillt tartalmazó sejtek képesek. A kloroplasztokban a klorofillon kivül karotinoidokból, fehérjékből és lipoidokból álló komplex vesz részt a fényenergia átalakitásában. Ez a komplex a látható szinkép vörös és kék szinü fényét hasznositja. Egy molekula cukor képződéséhez 24 fénykvantumra van szükség.

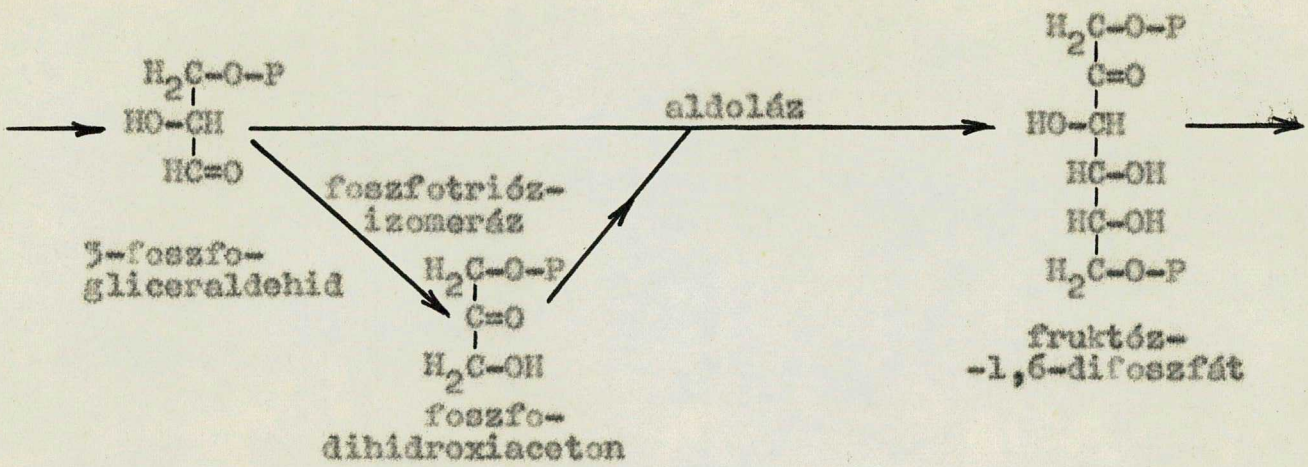
Régebben a formaldehidet tekintették a fotoszintézis elsődleges termékének. Formaldehidből épült volna fel „aldol-kondenzációval" láncszerűen a cukor és a keményitő:

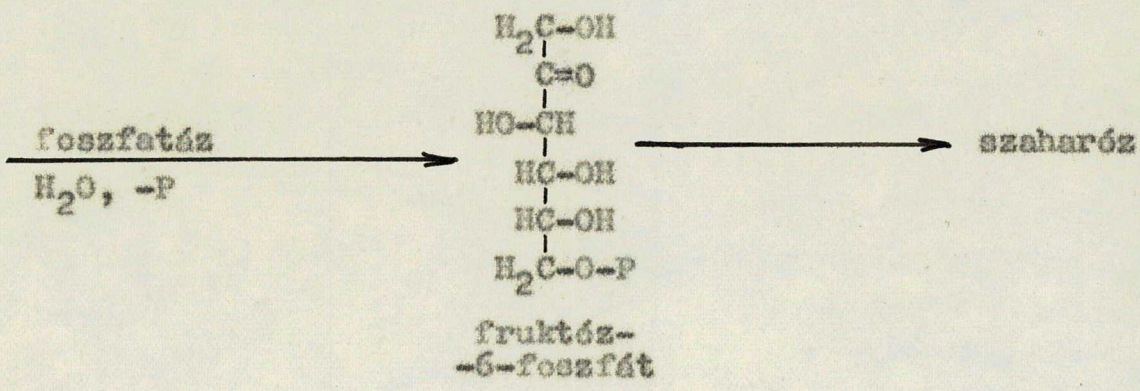


Ujabb vizsgálatok szerint a cukor másodlagos folyamat utján keletkezik. Nezgovorova /34/ kisérleteiben radioktiv szénnel jelzett széndioxidot használt répánál. Megállapitotta, hogy a fotoszintézis végbemenetele különböző utakon is lehetséges.

Calvin /5/ 1956-ban közölte a fotoszintézis véglegesnek látszó utját. Szerinte a levegő széndioxidja ribulóz-1,5-difoszfátból karboxidizmutáz hatására foszforglicerinsavvá alakul, mely reduktiv körülmények között foszfoglicerinaldehidet képez. A foszfoglicerinaldehidből épül fel aldoláz hatására a fruktóz-1,6-difoszfát. Egy molekula foszforsav lehasadása után képződő fruktóz-6-foszfát pedig a szaharóz-szintézis egyik komponense:







Munkámban foglalkozni kivánok a levélplazma kémiai összetételével és az összetételben mutatkozó azon különbségekkel, melyek a virusos sárgaság /Beta virus 4; beet yellows, stb./ hatására a levélben jelentkeznek.

A virusos sárgaság sulyos betegsége a cukorrépának. Elterjedése széles, csaknem minden földrészen megtalálható /45/. Hazánkban 1952-ben mutatta ki jelenlétét először Kovács /27/. Schultz /38, 39/ manometriás mérései szerint a fertőzött növényekben jelentősen csökken az asszimiláció és emelkedik a légzés. Spikes és Stout /44/ cukorrépalevélből izolált kloroplasztok fotokémiai aktivitását vizsgálta módositott Hill-reakcióval. A fertőzött növények aktivitása csak 6o %-át érte el az egészségesének. Az asszimiláció csökkenése és a légzés emelkedése következtében a tartalékanyagok - elsősorban a szaharóz - képződése és felhalmozódása csökken. A fertőzés 3o %-kal, sulyos esetekben 5o %-kal csökkenti a cukorrépa gyökér- és cukorhozamát /39,44/ és igy sulyos népgazdasági kárt okoz.

A fertőzés következtében lényegesen eltolódik a redukáló anyagok aránya a levéllemezben és a levélnyélben /42/:

1.táblázat.

	egészséges		fertőzött	
	A	B	A	B
levélnyél	114,2	16,49	76,6	2o,26
levéllemez	52,2	5,29	216,3	43,76
hányados	2,2	3,1o	o,35	o,46

Az eltolódás szorosan összefügg a három legfontosabb cukor koncentrációjának változásával /2.táblázat/:

2.táblázat.

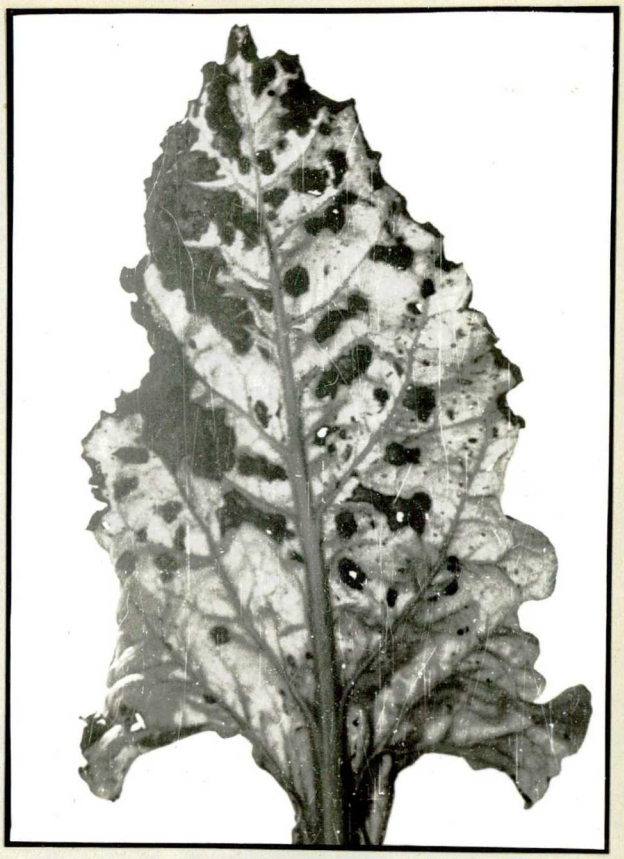
	egészséges	fertőzött
szaharóz	o,38 %	o,675 %
glukóz	o,15	1,4o
fruktóz	o,15	1,35

A virusos sárgaság mesterséges mechanikai átvitele eddig nem sikerült /3,52/. Az átvitel csak vektorok utján lehetséges. A vektorok közé számitjuk - a többi közül, mint a legjelentősebbeket kiemelve - a répa-levéltetűt /Doralis fabae Scop./ /27/, az őszibarack-levéltetűt /Myzus persicae Sulz./ /52/ és az eddig ismeretes egyetlen növényi vektort, az arankát /12/.

A virusos fertőzés jelentős változásokat okoz a növény összetételében /5o,52/. Munkám célja elsősorban az volt, hogy az egészséges és fertőzött növények között észlelhető különbségeket minél több oldalról kimutassam és lehetőleg megvilágitsam.

Vizsgálataimnál cukorrépalevéllel dolgoztam, mert a fertőzés és tünetei a levélen jelentkeznek:

1.ábra. Egészséges levél.



2.ábra. Virusos sárgasággal fertőzött levél.

A fehérjetartalommal kapcsolatos vizsgálatokhoz az alakos elemeket nem tartalmazó sejtplazmát használtam.

A növény bonyolult szervezetének felépitésében egyik legnagyobb szerepet a nitrogén játsza. A nitrogén-asszimiláció terméke a fehérje, mely a növényben lezajló kémiai folyamatok alkalmával felszabaduló energia felhasználásával, kemoszintézissel keletkezik.

A plazmafehérjék összetétele alig ismeretes. Viszont részletes adatok állnak rendelkezésünkre a cukorrépa kloroplasztjainak és leukoplasztjainak aminosav-összetételéről Sziszakjan /46,47/ vizsgálatai alapján. A kloroplasztokban több az aszparaginsav, glutaminsav, alanin és treonin, mint a leukoplasztokban, a leukoplasztokban ellenben több a glikokoll, szerin és arginin. A kloroplasztok fehérjéi frakcionált szétoldással a következő frakciókra bonthatók: nukleoproteid, α-kromoglobulinok, lipoproteid. A fehérjefrakciók tisztasága elektroforézissel és további ammoniumszulfátos frakcionálással jól igazolható /48,49/.

A plazmában lévő fehérjék mennyiségi és minőségi összetételéről részletes adatokat nyujtanak elektroforetikus és kisózási módszerek. Régóta általános törekvés, hogy a plazmafehérje „spektrális összetételét" laboratóriumi feltételek között, egyszerű, gyors kisérletekkel meg lehessen állapitani.

Sok egyszerű próba ismeretes, melyek jelzik a plazmafehérje összetételének változását.

Anyagkeverékek, melyek elektromos erőtérben vándorolni képesek és összetevőik töltésük folytán különböző vándorlási sebességet mutatnak szürőpapiron, elektroforézissel szétválaszthatók. A módszernek nagy jelentősége van fehérjekeverékek /albumin - globulin/ szétválasztásában és mennyiségi meghatározásában.

A papirelektroforézist több esetben felhasználták levélfehérjék /25/, valamint különböző virusokkal fertőzött dohánylevelek fehérjéinek szétválasztására /24/.

Schneider és Sparmann /37/ a cukorrépa gyökerének és levelének fehérjéit csak nagyfeszültséggel /1500 V/ és magas pH /11,5/ mellett voltak képesek vándoroltatni. Mivel nagyfeszültségü készülék nem áll minden laboratórium rendelkezésére, szükségesnek látszott eldönteni azt, hogy elektroforézis valóban csak nagyfeszültséggel hajtható-e végre?

Fehérjéknek elektroferogrammokon való kimutatására, festésére az irodalomban számos módszer ismeretes. Kérdés, hogy az idézett munkákban /24,25/ alkalmazott amidofekete 10 B mellett más, fehérjefestésre használható módszer mennyire alkalmazható a cukorrépa plazmafehérjéinek festésére?

A cukorrépalevél sejtplazmája normális fiziológiás körülmények között 2,2-2,8 % fehérjét tartalmaz. A plazmafehérje különböző fehérjefrakciók komplex rendszere. Az egyes frakciók tulajdonságai az előállitási módszerektől jelentősen függenek.

A levélplazma fehérjéi lényegében albumin és globulin frakciókból állnak. Chibnall /7/ szerint a növényi citoplazma fehérjéi a glu-

tolinekhez hasonlitanak. Papirelektroforetikus vizsgálataim során kimutattam az albumin- és globulinfrakció jelenlétét, azonban e két főfrakció között is találtam fehérjéket az elektroferogrammokon. Ezeket első megközelitésre euglobulinoknak /17,32/ és pszeudoglobulinoknak /8,43/ tekintettem.

Már régen ismeretes, hogy koncentrált sóoldatokkal a fehérjék oldataikból kisózhatók. A plazmafehérjék sófrakcionálására több módszert vezettek be, melyek közül az ammoniumszulfátos kisózás /18/ volt a plazmafehérje-frakcionálás alapja. Később Howe /2o/ a nátriumszulfátos frakcionálást dolgozta ki.

Sokkal részletesebb felvilágositást lehet nyerni káliumfoszfát keverékekkel végrehajtott fehérjefrakcionálásnál /41/. A nyert „oldékonysági görbe" jellemzője a fehérjeösszetételnek. Az oldékonysági görbe felvételénél az ordinátán a kicsapott fehérje leszürt oldatában maradt nitrogén vagy fehérje mennyisége, az abszcisszán az oldatban lévő káliumfoszfát moláris koncentrációja van feltüntetve. Az igy nyert görbének több törése van, ezek a törések jelentik a fehérjefrakciók kicsapásának végpontjait. Kérdés, hogy az egészséges és virusos sárgasággal fertőzött cukorrépa levélplazmájának oldékonysági görbéi között van-e kimutatható különbség?

Az irodalomban már ismeretes /52/, hogy a virusokkal fertőzött növények összesnitrogéntartalma - ennek következtében fehérjetartalma is - általában kisebb, mint az egészségesé. A fehérjetartalom csökkenését a virusos sárgasággal fertőzött cukorrépalevelekben több esetben is megfigyelték /45,5o/.

A klinikai diagnosztikai gyakorlatban és az irodalomban ismeretesek olyan reakciók, melyek a fehérjefrakciók - elsősorban a γ-globulinfrakció - változásával, kicsapásával kapcsolatosak /1, 29/. Ezek a reakciók két csoportra oszthatók: a labilitási próbáknál a kóros fehérjefrakció csapódik ki, mig a kolloid-próbáknál a kóros fehérje csapja ki az oldatához adott kolloidokat oldataikból. Ugy a labilitási-, mint a kolloid próbák emberi és állati megbetegedések azonositására jól felhasználhatók.

A fehérjetartalom mennyiségi meghatározása viszonylag hosszadal-

mas. Ha a fehérjék mennyisége, kémiai összetétele és tulajdonsága különböző, akkor a fehérjekicsapásokon alapuló módszerekkel is kimutatható különbségnek kell lennie az egészséges és virusos sárgasággal fertőzött levelek fehérjéi között.

Ugy elméleti, mint gyakorlati szempontból egyaránt fontos a virusos fertőzöttség kimutatása, diagnosztizálása. Növények virusos fertőzésének kimutatására az irodalom számos adatot közöl /2,26, 31,5o stb./. Beal, Preston és Mitchell /2/ szerint a trifeniltetrazoliumklorid több növényi virus - igy a cukorrépa virusos sárgaságának - kimutatására is alkalmazható. Trzebinski /5o/ jód és etanollal elszintelenitett levelekben a fertőzés hatására felhalmozódott keményitő közötti reakciót használta fel a fertőzöttség fokának meghatározására.

Egyes növényi termékek molekulái közötti fizikai és kémiai különbségek magyarázata igen gyakran meglehetősen nehéz, mivel ezek a különbségek tulságosan kicsinyek lehetnek ahhoz, hogy a jelenleg rendelkezésünkre álló fizikai-kémiai vagy más analitikai módszerrel képesek lennénk kimutatni. Ez érzékelhető bizonyos makromolekulák - fehérjék, poliszaharidok vagy nukleoproteidek - analizisénél.

Az ultracentrifugálást, a diffuziót és az elektroforézist elterjedten alkalmazzák a makromolekulák kutatásának területén. Ezek a módszerek azonban nem nyujtanak elég felvilágositást a molekula konfigurációját illetően. Az oszlopkromatográfia és az oszlopelektroforézis alkalmazása az utóbbi években lehetővé tette rokonanyagok közötti apróbb különbségek kimutatását is.

Még sokkal érzékenyebb analizis alapjául lehet felhasználni a makromolekulák antigén tulajdonságait. Ez az analizis képes kimutatni a belső makromolekuláris szerkezet legfinomabb változásait. Igy jutottak el az antitestek felhasználásához. Az antitesteket az állati szervezet termeli immunológiai, szerológiai alapelvek szerint; az antitestek erősen fajlagos reagensek, minőségi és mennyiségi meghatározásokra alkalmasak.

Az orvostudományban alkalmazott szerológiai reakciók alapelveit

sikerült általában alkalmazni növényi virusok kimutatására is. Napjainkban a szerológiai módszerek ugyszólván nélkülözhetetlen eszközzé váltak a növényi viruskutatásban és sikeresen állitották elő számos ismert növényi virus specifikus antiszérumát.

A szerológiai módszereket bevezették a gyakorlatba növényi virusok azonositására. A mezőgazdaságban és kertészetben virusmentes növényeknek - mint nemesitési alapnak - kiválogatása gyakorlattá vált és ennek a munkának jelentős része szerológiai módszereken alapul.

A szerodiagnosztikai módszerek közül a növényi virusfertőzések kimutatására leginkább a precipitációs próbákat használják egyszerüségük miatt. Ha egy állatba testidegen patogén anyagot juttatunk, vérében olyan globulintipusu fehérjék /antitestek/ jelennek meg, melyek a fertőzést kiváltó anyaggal in vitro kombinálódni képesek. A kombinálódás szemmel is láthatóvá tehető.

A növényi fehérjék - és a növényi virus-nukleoproteidek is - az eddig végzett kisérletek többségében jó antigéneknek bizonyultak. A fajlagos antitesteket tartalmazó immunsavó előállitására nyulat, tengerimalacot, szárnyasokat és lovat használtak fel. Ez utóbbi esetben emlitett lószérumot burgonya X-virus diagnosztizálására készitették /4o/.

A cukorrépa virusos fertőzésének kimutatására az irodalom szerint eddig lószérumot nem állitottak elő. Érdemesnek látszott megvizsgálni, hogy a virusos sárgasággal fertőzött cukorrépa présnedve antigénként felhasználható-e és az immunizált ló szérumával a fertőzés kimutatható-e?

Tárgyalás.

1. A vizsgálati anyag előkészitése.

A szántóföldből származó cukorrépaleveleken sok volt a föld és a homok. Ezeket a mechanikai szennyeződéseket nedves vattával távolitottam el. A levélnyeleket és a főereket ugyancsak eltávolitottam, mert fehérjeösszetételük lényegesen különbözik a levéllemezekétől. A plazma előállitására a levéllemezeket először ledaráltam, majd finom lyukméretü selyem szitaszöveten átpréseltem. Ezt a présnedvet lecentrifugáltam, a felülúszó, lipoidtartalmu réteget vizsugárszivattyuval szivattam le. A centrifugált nedv már alkalmas volt egyes kisérletek elvégzésére. Olyan esetekben pedig, amikor teljesen tiszta sejtplazmára volt szükségem, a centrifugált présnedvet még Seitz-szürőn is átszürtem.

2. Fehérjetartalom meghatározása.

A fehérjetartalmat mikro Kjeldahl-módszerrel határoztam meg friss levélben és az 1. 2.pont /Kisérleti rész/ szerint készitett plazmában. Az egészséges és virusos sárgasággal fertőzött levelek fehérjetartalmát a 3.táblázat mutatja:

3.táblázat.

Minta		Fehérjetartalom %	Bemérések száma
Friss levél	egészséges	8,88 ± o,31	16
	virusos	6,83 ± o,45	15
Plazma	egészséges	2,41 ± o,36	18
	virusos	1,73 ± o,19	16

A nyert adatok alapján megállapitható, hogy a fertőzött levelek

és plazmájuk lényegesen kevesebb fehérjét tartalmaznak, mint az egészségesek. Ez a megállapitás jól egyezik az irodalomban már közölt adatokkal /42,45,52/, azzal a különbséggel, hogy kisérleteimben kb. 1 %-kal magasabb fehérjetartalmat állapitottam meg.

3. Papirelektroforézis.

Papiron végzett elektroforetikus vizsgálatokkal kivántam egyrészt eldönteni, hogy alacsony feszültséggel /100-120 V/ és kevésbé lugos pufferrel /pH 8,6/ végre lehet-e hajtani az elektroforézist, másrészt, hogy az irodalomban ismeretes módszerek mennyire alkalmasak fehérjefestésre, valamint kimutatható-e különbség az egészséges és fertőzött növény levélplazmájának fehérjeösszetételében.

Schneider és Sparmann /37/ - más szerző munkájára is támaszkodva - megállapitották, hogy a cukorrépa fehérjéi a szokásos körülmények között /100-300 V/ nem vándorolnak. A gyökér- és levélfehérje vándorlását csak akkor érték el, amikor nagyfeszültséget /1500 V/ és viszonylag magas pH-t /11,5/ alkalmaztak. Megállapitásaik érvényesek a gyökér fehérjéire, de a levélplazma fehérjéknek elektroforézisét 100-120 V között, 8-10 mA-es terheléssel, pH 8,6-os pufferrel eredményesen végeztem.

Az idézett szerzők szerint a vándorlás azért nem lehetséges, mert a szokásos körülmények között erős adszorpció lép fel a fehérje és a kivonat nem vándorló komponensei között, és mert a hordozón /papiron/ való fehérje-adszorpció is elképzelhető. Elektroferogrammjaimon a felvitel helyén valóban kimutatható nem-vándorló anyag jelenléte, azonban sem ez, sem az adszorpció nem volt befolyással a levélplazma fehérjefrakcióinak vándorlására.

A papir telitésére csak semleges vagy lugos puffert alkalmazhattam, mert savanyu közegben a fehérjék irreverzibilisen kicsapódnak és a plazma további vizsgálatra alkalmatlan lesz.

A savanyu közeg alkalmatlanságát bizonyitja a cukorrépalevél

nyers présnedvének acidi-alkalimetriás titrálása is. A titrálási görbe pH 3-7 közötti szakaszának pH 4,3-4,4 között inflexiós pontja van, ez felel meg a plazmafehérjék izoelektromos pontjának. [Kanngiesser /25/ a dohánylevél plazmafehérjéinek izoelektromos pontját pH 4,8-nak találta.]

Lugos közegben a fehérjék nem csapódnak ki és az izoelektromos ponttól magasabb pH-k felé haladva nő a fehérjefrakciók időegység alatti vándorlási sebessége.

A pufferek alkalmazhatóságát pH 7,4-9,o között vizsgáltam meg. Alacsonyabb pH-nál a szétválasztás lassunak bizonyult vagy egyáltalában nem történt vándorlás. Legalkalmasabb volt a Michaelis-féle veronál-puffer /1o,15,53/, melynek pH-ja 8,6-9,o, ionerőssége μ= o,1 volt.

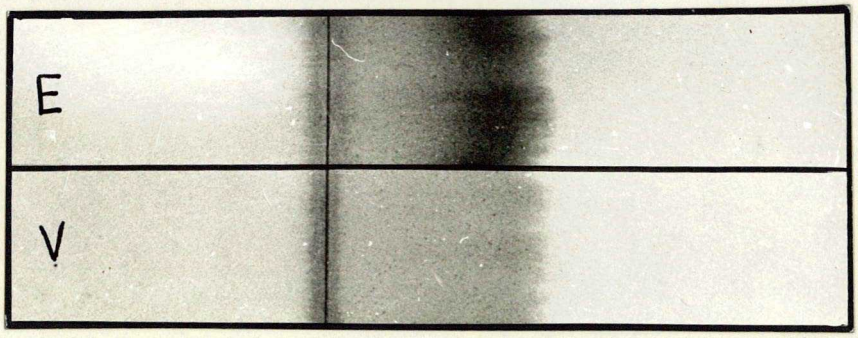
Az elektroforézishez kizárólag Macherey-Nagel 214. papirt használtam. Ugy látszik, hogy ez a papirfajta legalább kétféle minőségben kerül forgalomba. A különbség napfényen nem ismerhető fel, de ultraibolya fényben /366 nm/ az egyik fajta élénk kék, a másik sötétibolya szinben fluoreszkál. /Floureszcens anyagok kimutathatóságát a kék fluoreszcencia erősen zavarja; a levélplazma elektroforézise után a csikokon maximálisan 12 fluoreszkáló sávot kaptam, ezek közül négy kéken fluoreszkál./

Elektródként jónak bizonyult a sima platinalemez; a kezdetben használt szénelektródok oldódásukkal szennyezték a papirt és a puffert.

A 3 x 26 cm-es papircsikra igen keskeny sáv alakjában tudtam felvinni 2o μl plazmát. A vizsgálandó anyag felvitelére alkalmas volt a 2o μl térfogatu Sahly-pipetta. A futtatási időt a kivánt elmozdulástól függően 3-6 óra között változtattam. Kisérleteim körülményei mellett a leggyorsabban vándorló sáv - az albumin - óránként kb. 1 cm-t tett meg.

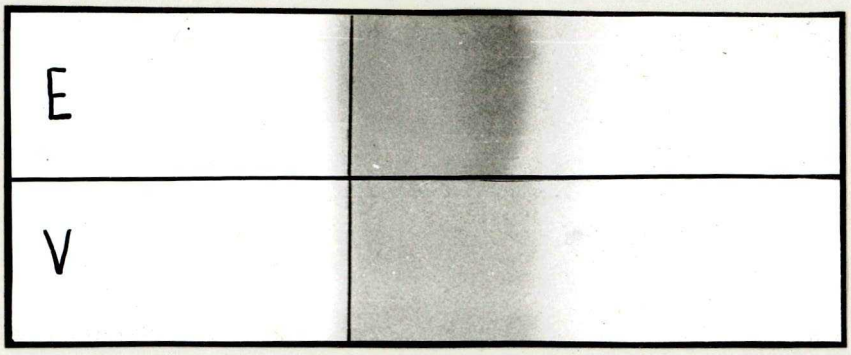
Futtatás után az elektroferogrammokat előremelegitett szárítószekrényben, üveglapon szárítottam meg, a festés követelményeinek megfelelő hőmérsékleten. A megfestett elektroferogrammokat mosás után 5o-6o C°-on szárítottam meg.

Grassmann és Hannig /13,14/ eredeti módszerével, amidofekete lo B-vel festett elektroferogrammokon egészséges levélnél a felvitel helyén halványabb sávot, az anód felé elmozdulva az albuminfrakcióra jellemző, erősebb festődést találtam. A közbeeső részen csaknem egyenletes a halvány festődés. Fertőzött levél esetén a startvonalon a γ-globulinra jellemző sáv erősen, az albuminfrakció alig festődött. A két sáv között festődés alig volt:



3.ábra. Egészséges /E/ és virusos sárgasággal /V/ fertőzött cukorrépa levélplazmájának elektroferogrammja Grassmann és Hannig módszerével /13,14/ festve.

A festési eljárás Pučar /35/ szerinti módositásával csaknem azonos eredményt kaptam. A festékoldatban való melegités következményeként a papir annyira erősen adszorbeálta a festéket, hogy az alap szinezettsége még tizszeres mosás után sem tünt el teljesen. Az elektroferogrammokon egészséges levélnél két erősen festődött sávot találtam. Egyik a felvitel helyén maradó globulinnak, a másik az anódosan elmozdult albuminnak felel meg. A két frakció közötti felület szintén festődött. Virusos levélnél a startvonalon megfestődött globulin intenzitása azonos az egészségesével, de az albuminsáv sokkal gyengébb:

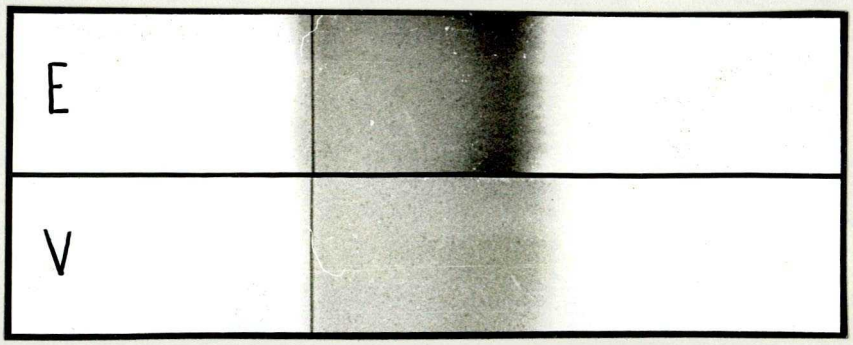


4.ábra. Egészséges /E/ és virusos sárgasággal /V/ fertőzött cukorrépa levélplazmájának elektroferogramja amidofekete 10 B-vel festve /35/.

Az amidofekete 10 B-vel végzett festés egy másik módositása Peters és Vuylsteke-től /16/ származik. A melegitésnek itt is meg van az a hátránya, hogy a fehérjementes helyekről a festék nem távolitható el teljesen.

A fehérjét tartalmazó sávok festődése hasonló volt az előző módszeréhez. Jól lehetett festeni az albumin- és globulinfrakciót, valamint a két frakció közé eső területet. Az albumin mennyisége egészséges plazmában nagyobb volt, mint a virusosban.

Az azokarmin B-t Turba és Enenkel /51/ ajánlotta fehérjéknek elektroferogrammokon való festésére. Módszerükkel a fehérjét tartalmazó sávok kivételével a papir csaknem teljesen fehérre volt mosható:



5.ábra. Egészséges /E/ és virusos sárgasággal /V/ fertőzött cukorrépa levélplazmájának elektroferogramja azokarmin B-vel festve /51/.

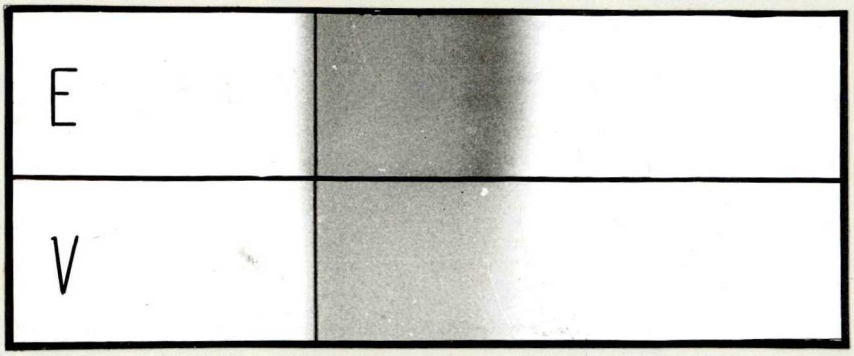
Egészséges levél plazmája esetén a startvonalon jól felismerhető a globulin- és az anód felé elmozdult, igen erősen festődött albuminsáv. A két frakció közötti terület halványan festődött. A virusos levél plazmájának két fehérjefrakcióját tartalmazó sávok lényegesen kevésbé festődtek.

Durrum /11/ módszerével, brómfenolkékkel nyert festések teljesen hasonlóak voltak, mint az előző, azokerminos festések. A papir előírás szerinti teljes mosását nem végeztem el, mert már a csapvizes mosással is használható elektroferogrammokat nyertem.

A fehérjéknek azt a tulajdonságát, hogy nehézfémsókkal oldataikból irreverzibilisen kicsaphatók, megkíséreltem felhasználni elektroferogrammokon való kimutatásukra. Ezért 2 %-os vizes ólomacetát-oldatban - hidegen és melegen - tartottam az elektroferogrammokat. Szürőpapirok közötti kipréselés után a még nedves papircsikokat H_2S gázatmoszférába helyeztem, de csak határozatlan és elmosódott PbS foltokat kaptam; a szétválasztott fehérjefrakciók helyzete nem volt felismerhető.

Ugyancsak nem értem el eredményt, amikor az elektroferogrammokat uranilacetát o,o5 %-os vizes oldatán huztam át. Az uranilacetát feleslegének kimosása és szárítás után az uranil-vegyületekre jellemző zöld fluoreszcencia ultraibolya fényben nem mutatkozott, még az előrevárhatóan fehérjetartalmu helyeken sem.

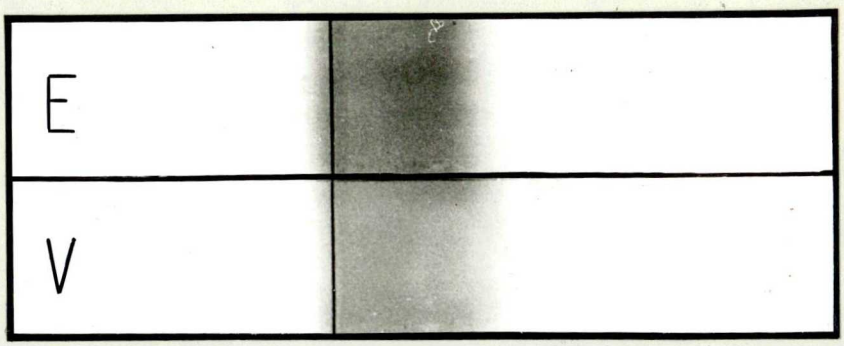
Nagyon szép festődéseket kaptam a klinikai diagnosztikai gyakorlatban elterjedten használt savanyu fukszinos festéssel. Az egészséges levél plazmájának frakciói - különösen az albumin - sokkal erősebben festődtek, mint a fertőzötté:



6.ábra. Egészséges /E/ és virusos sárgasággal /V/ fertőzött cukorrépa plazmafehérjéinek elektroferogrammjai savanyu fukszinnal festve.

Lichtgrün FS-sel Caspani és Magistretti /6/ eljárásával nem kaptam eredményt. Az általuk alkalmazott festékoldat annyira hig, hogy az elektroferogramm fehérjét tartalmazó helyei 24 órás festés után sem színeződtek.

Rideout és Prichard /36/ módszerével, ugyancsak Lichtgrün FS-sel, teljesen kielégitő festődést kaptam:



7.ábra. Egészséges /E/ és virusos sárgasággal /V/ fertőzött cukorrépa plazmafehérjéinek elektroferogrammjai Lichtgrün FS-sel festve.

Ellenőrzés céljából elvégeztem a gyökérplazma elektroforézisét is. Az elektroferogrammokon savanyu fukszinos festéssel alig festődő fehérjefrakciót kaptam, mely lo órás futtatás alatt sem vándorolt.

A tiz festési módszer összehasonlitása alapján az alábbi megállapitásokat tehetjük:

1. Öt festési módszer különösen alkalmas a cukorrépalevél plazmafehérjéinek elektroferogrammokon való kimutatására. Ezek a módszerek a következők:

   amidofekete 10 B,
   azokarmin B,
   brómfenolkék,
   savanyu fukszin és
   Lichtgrün FS.

   A savanyu fukszinnal végzett festés bizonyult a leghasználhatóbbnak olcsósága, egyszerüsége és kiváló festőképessége miatt.

2. A fehérjefrakciók nem homogének. A globulinfrakció folyamatosan olvad bele az albuminba. A két főfrakció között elhelyezkedő fehérjék feltételezhetően a citoplazma glutelintipusu fehérjéi /7/, vagy pszeudo- és euglobulinok keveréke.

3. A legmozgékonyabb fehérjefrakció az albumin és ez a frakció festődik egészséges növénynél a legerősebben. Az albuminsáv egészséges levélnél 2,1-szer több fehérjét tartalmaz, mint a virusosnál.

4. A felvitel helyén maradt γ-globulinfrakció egészséges levél plazmája esetén 1,6-szer nagyobb, mint a virusos sárgasággal fertőzöttnél.

5. Azt tapasztaltam, hogy a katód irányában is mozdult el egy fehérjefrakció. A frakció erősen savas jellegü, mert a lugos pufferben /pH 8,6/ is képes a katód felé elmozdulni. Ez a sáv virusos plazmánál erősebb, mint egészségesnél, sőt az esetek nagy részében egészséges plazma elektroferogrammjain meg sem található. A jelenség magyarázatát abban látom, hogy:

a./ a látszólag egészséges növény plazmája az esetek egy részében latensen fertőzött volt. Feltételezhető, hogy ez a savas fehérjefrakció azonos lehet a virusfehérjével;

b./ az egészségesnek látszó növény plazmájában előforduló savas fehérje mennyisége a fertőzés hatására növekszik vagy lizise gátolt;

c./ a savanyu fehérje a virus jelenléte folytán másodlagosan keletkezett anomália, esetleg immunfehérje.

A normális fiziológiás cukorrépalevél sejtplazmájának 2,2-2,8 %-át kitevő összfehérje nem homogén, hanem több fehérjefrakció komplex rendszere. A két fő fehérjefrakciót - az albumint és globulint - papirelektroforézissel sikerült jól kimutatnom. Az elektroferogrammokon azonban e két főfrakció között is jelentkezett egy halványabban festődött fehérjesáv, mely folyamatosan kötötte össze az albumint és globulint. Feltételezhetem, hogy ez az átmeneti fehérjefrakció euglobulinok /17,32/ és pszeudoglobulinok /8,43/ keveréke.

4. A cukorrépalevél plazmafehérjéinek káliumfoszfátos frakcionálása.

A fehérjéknek azt a tulajdonságát, hogy oldataikból koncentrált sóoldatokkal kisózhatók, régen ismerik. A plazmafehérjék sófrakcionálására Hofmeister /18/ ammoniumszulfátot, majd Howe /2o/ nátriumszulfátot használt.

A plazmafehérjék frakcióinak vizsgálatára további módszerként ismeretes a káliumfoszfátos frakcionálás. Ha a plazmát különböző koncentrációju káliumfoszfát-oldatokba visszük, akkor annál több fehérje csapódik ki, minél magasabb a foszfátkoncentráció /41/.

A frakcionálási adatok kiértékeléséhez „oldékonysági görbét" kellett felvennem. Az oldékonysági görbe ábrázolásánál az ordinátára a kicsapott fehérje leszürt oldatában maradt fehérje százalékos mennyiségét, az abszcisszára az oldatban lévő káliumfoszfát koncentrációját vittem fel mol/liter egységekben. A görbe megrajzolásánál több töréssel rendelkező görbét kaptam; a törések jelentik az egyes fehérjefrakciók kicsapásának végpontjait.

A vizsgálati anyagot a kisérleti rész 1.2. pontja szerint készitettem, tehát olyan plazmát használtam, mely alakos elemeket nem tartalmazott.

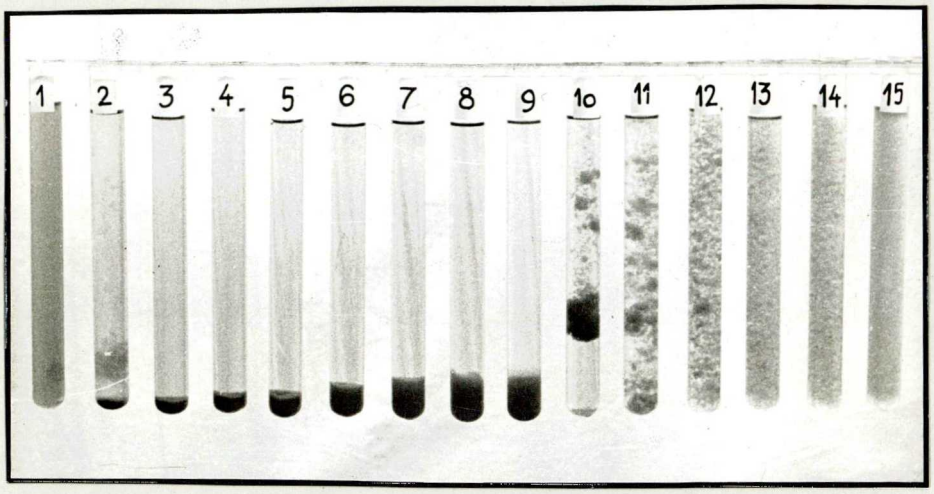
Tekintettel arra, hogy a répa leveléből kipréselt és szürt plazma pH-ja 6,2-6,8 között volt, a kisérletek végrehajtásánál követhettem a már kidolgozott metodikát /1/.

2-2 ml sejtplazmát növekvő koncentrációju káliumfoszfát-oldattal /pH 6,55/ kémcsövekben elegyitettem az alábbi 4.táblázat szerint:

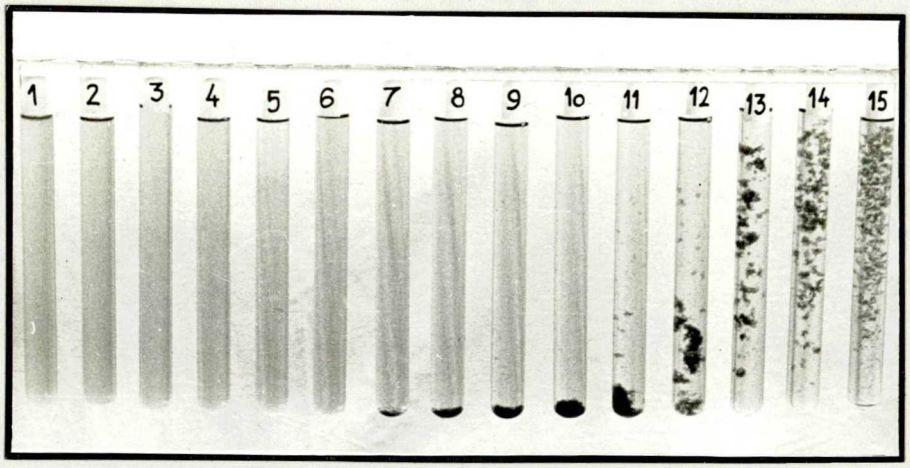
4.táblázat.

Kémcső-szám	Foszfát ml	Fiziol. só ml	Foszfát molaritás
1.	-	18	o,oo
2.	5	13	o,75
3.	6	12	o,9o
4.	7	11	1,o5
5.	8	1o	1,2o
6.	9	9	1,35
7.	1o	8	1,5o
8.	11	7	1,65
9.	12	6	1,8o
1o.	13	5	1,95
11.	14	4	2,1o
12.	15	3	2,25
13.	16	2	2,4o
14.	17	1	2,55
15.	18	-	2,7o

Ekkor a foszfátkoncentrációtól függően a plazmafehérjék egy része kicsapódott /8. és 9.ábra/. A kémcsöveket 25 C°-os vizfürdőben állni hagytam, közben időnként felráztam. 16 óra mulva az oldatokat leszürtem és a szüredékben meghatároztam a százalékos fehérjetartalmat /5.táblázat/.



8.ábra. Egészséges levél plazmájából káliumfoszfáttal kicsapott fehérjék 16 órás állás után.



9.ábra. Virusos sárgasággal fertőzött levél plazmájából káliumfoszfáttal kicsapott fehérjék 16 órás állás után.

A kapott eredményeket - az előbbiek szerint - grafikusan ábrázolva kaptam a plazmafehérjék oldékonysági görbéjét /10.ábra/.

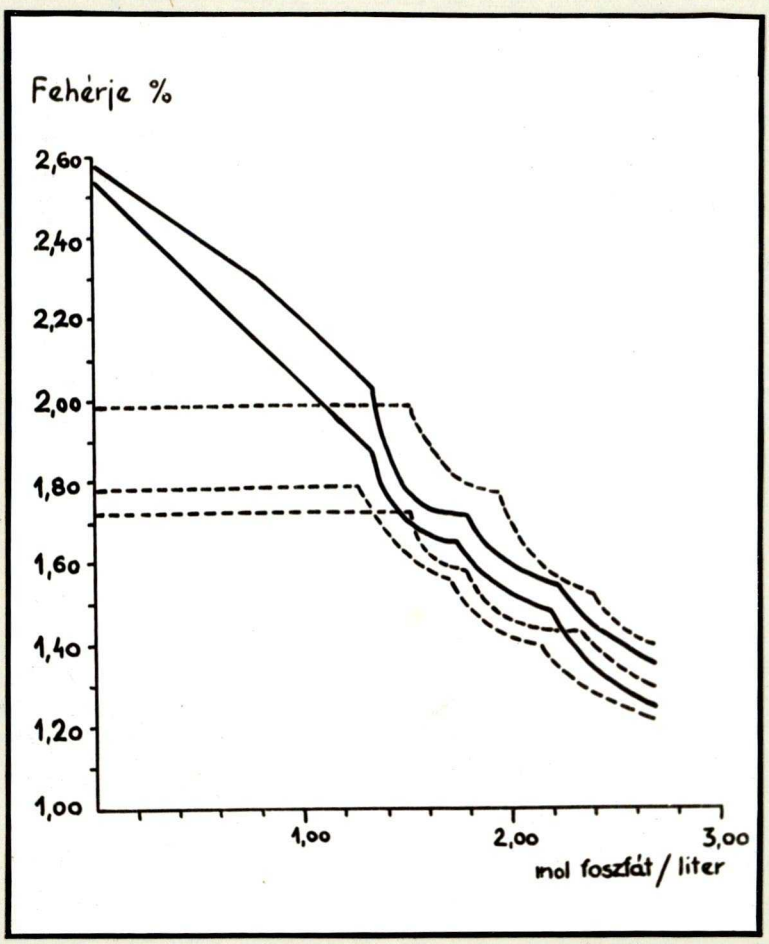
A 0,00 foszfátkoncentrációnál feltüntetett adatok /1.sz.kémcső/ a plazma összfehérjetartalmát mutatják.

Kísérleteimhez egészséges és vírusos sárgasággal fertőzött cukorrépalevelek plazmáját használtam fel. A fehérjetartalomban mutatkozó különbségek már előbb valószínűvé tették, hogy az egészséges és fertőzött levelek citoplazmájának oldékonysági görbéi nem lesznek azonosak.

5.táblázat.

E = egészséges, V = vírusos plazma.

Kémcső szám	%-os plazmafehérje-tartalom				
	E	E	V	V	V
1.	2,54	2,58	1,78	1,72	1,98
2.	2,18	2,31	1,78	1,72	1,98
3.	2,11	2,26	1,78	1,72	1,98
4.	2,03	2,18	1,78	1,72	1,98
5.	1,94	2,1o	1,78	1,72	1,98
6.	1,86	2,o1	1,72	1,72	1,98
7.	1,69	1,79	1,62	1,72	1,98
8.	1,66	1,72	1,57	1,6o	1,87
9.	1,62	1,71	1,49	1,58	1,79
1o.	1,54	1,61	1,43	1,48	1,77
11.	1,5o	1,57	1,4o	1,44	1,62
12.	1,43	1,53	1,34	1,43	1,55
13.	1,33	1,44	1,28	1,4o	1,52
14.	1,28	1,39	1,24	1,33	1,43
15.	1,24	1,35	1,21	1,29	1,4o



10.ábra. Egészséges és virusos plazma oldékonysági görbéi.

Az oldékonysági görbék lefutása alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

1. A virusos sárgasággal fertőzött levelek plazmája jóval kevesebb - o,56 %-kal - fehérjét tartalmaz, mint az egészségesé /8., 9. és 10.ábra/.

2. A fertőzött levelek plazmájából a globulinfrakció gyakorlatilag teljesen hiányzik és csak 1,2o mol/liternél nagyobb foszfátkoncentráció esetén csapódik ki mérhető mennyiségü fehérje.

3. Az egészséges levelek globulinfrakciója közel lineárisan csapódik ki a növekvő foszfátkoncentrációval.

A 2. és 3.pontban feltüntetett különbségek a papirelektro-

ferogrammokon /3., 4., 5., 6. és 7.ábra/ is jól felismerhetők.

4. A görbék 1,2o molaritásnál nagyobb foszfátkoncentrációknál több törést mutatnak. Azonban az igy kapott fehérjefrakciókat más módszerrel /elektroforézissel/ sem felbontani, sem azonositani nem tudtam. Itt hivatkoznom kell a bevezetőben már elmondottakra: a frakciók tulajdonságai függenek az előállitás módjától.

5. Az 1,2o molaritásnál magasabb foszfátkoncentrációkkal kapott három fehérjefrakció végpontjai közel azonos - a kisérleti hibák határain belüli - koncentrációknál jelentkeztek.

6. A foszfátos frakcionálással kapott oldékonysági görbék más megvilágitásba helyezik az elektroferogrammok értékelését is: a globulinfrakció, mely csak az egészséges levél plazmájának elektroferogrammjain jelentős, és az albuminfrakció között elhelyezkedő fehérjefrakció nem pszeudo- és euglobulinok keveréke, hanem nagyobb valószinüséggel albumin.

7. Glutelin tipusu fehérje jelenléte ugyancsak kizárt, mert a reverzibilisen kicsapódott fehérjék vizben jól oldódtak, különböző koncentrációju savakban azonban nem.

A fehérjefrakciók végleges megismeréséhez további vizsgálatok szükségesek.

5. Viruskimutatási, kolloidlabilitási és fehérjekicsapási reakciók.

A cukorrépa virusos sárgaságának kimutatására szerológiai reakciók ismeretesek /21,22,26,33/. Azonban a szerológiai viruskimutatási reakciók előkészitése meglehetősen hosszadalmas műveletet igényel. Ezért megkiséreltem, hogy egyszerübb, gyorsabb módon mutassam ki a cukorrépa fertőzöttségét.

Megismételtem a Beal, Preston és Mitchell /2/ szerinti 2,3,5--trifeniltetrazoliumkloridos viruskimutatási módszert, mely a

redukáló anyagok jelenlétén alapul. Ez a módszer azonban alkalmatlannak bizonyult a cukorrépa virusos sárgaságának kimutatására, annak ellenére, hogy a szerzők ezt számos növényi virus kimutatására, igy a cukorrépa virusos sárgaságára is alkalmasnak találták.

A módszer alkalmazásával a következő eredményeket kaptam:

a./ egészséges és fertőzött levelek levélmetszetei összefüggés nélkül adtak pozitiv és negativ reakciót,

b./ levélnyélmetszetek egyáltalán nem reagáltak.

Eddigi munkám során megállapitottam, hogy az egészséges és a fertőzött cukorrépalevelek fehérjéinek mennyiségi és minőségi összetételében jelentős különbségek vannak. Az összfehérjetartalmat Kjeldahl-módszerrel vizsgálva mindenkor arra az eredményre jutottam, hogy a fertőzött levél össznitrogén-, ennek következtében fehérjetartalma kevesebb, mint az egészségesé. Vizsgálati eredményeim megegyeznek az irodalomban már közölt eredményekkel /45,5o,52/.

A fehérjék, elsősorban a globulinok kicsapásán alakuló kolloidlabilitási reakciók alkalmasnak látszottak egészséges és fertőzött növények közötti különbségek kimutatására.

A fehérjekimutatási reakciók egyik csoportját alkotják a klinikai diagnosztikai gyakorlatban ismeretes kolloidlabilitási reakciók. Ezek a reakciók eredetileg a γ-globulin mennyiségének változásával kapcsolatosak. A kolloidlabilitási próbáknál a fehérje csapódik ki a hozzáadott reagens, illetve reagens és hőkezelés együttes hatására.

Mivel korábbi kisérleteim mennyiségi különbségeket mutattak ki az egészséges és virusos sárgasággal fertőzött cukorrépalevelek fehérjetartalmában, várható volt, hogy kolloidlabilitási próbákkal is eltérő eredményeket fogok kapni.

A kisérletekben felhasznált levélplazmát a kisérleti részben leirtak szerint /1.2./ készitettem.

Kisérleteim során az alábbi kolloidlabilitási és fehérjekicsapási reakciókat végeztem el:

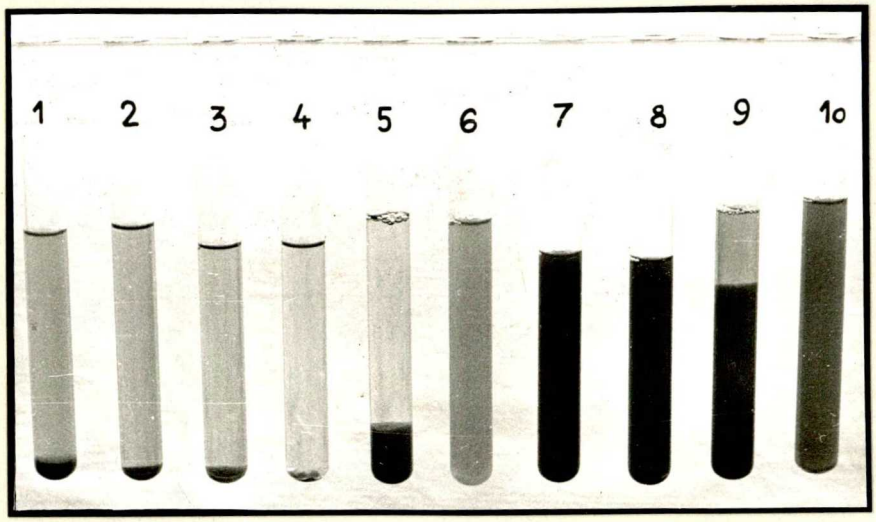
5.1. Darányi-féle kolloidlabilitási reakció,
5.2. Viz-próba,
5.3. Jód-próba,
5.4. Kamngiesser-féle reakció,
5.5. Hayem-próba,
5.6. Takata-Ara reakció,
5.7. Weltmann-féle reakció,
5.8. Gerlóczy-féle reakció,
5.9. Kürten-féle formalin reakció,
5.1o. Cinkszulfát-próba,
5.11. Fehérjekicsapási reakciók.

5.1. Darányi-féle kolloidlabilitási reakció. A levélprésnedvhez 2 %-os NaCl oldattal higitott EtOH-t adtam. Összerázás után 2o percre 6o C°-os vizfürdőbe tettem. A termolabilis fehérjék részben azonnal, részben néhány órás állás után teljesen kicsapódtak és a kémcsövek aljára ülepedtek /11.ábra. 1-2.kémcső/.

5.2. Viz-próba /Dreyfus/. A présnedvek 1:2 - 1:1o desztillált vizes higitásokban 3-4 órás állás után erős zavarosodást mutattak, 24 óra mulva a kivált csapadék leülepedett. A csapadék felett az oldatok teljesen tiszták voltak. Az egészséges présnedvből kb. kétszerannyi csapadék vált ki, mint a fertőzöttből /11.ábra. 3-4.kémcső/.

5.3. Jód-próba /Mallen/. A présnedveket azonos térfogatu higitott Lugol-oldattal elegyitettem. Az egészséges levél présnedve azonnal bőséges csapadékot adott, mig a virusos csak opalizálást mutatott /11.ábra. 5-6. kémcső/.

A virusos fertőzés kimutatására legjobbnak bizonyult reakció. A reakció érzékenységét ebben az esetben a csapadék szinezettsége fokozza.



11.ábra. Kolloidlabilitási reakciók: 1-2. Darányi-féle kolloidlabilitási reakció, 3-4. Víz-próba, 5-6. Jód-próba, 7-8. Kanngiesser-féle reakció, 9-1o. Hayem-próba. 1,3,5,7,9: egészséges, 2,4,6,8,1o:virusos.

Mivel a kémcsőreakció kivitelezéséhez viszonylag sok /1-2 ml/ présnedv szükséges, ezért a reakciót szabadföldön is alkalmazható csepp-reakciónak dolgoztam ki.

Kézipréssel segítségével 4o-5o cm^2 felületű répalevelet kipréseltem. Mélyített tárgylemezen egy csepp présnedvet 2 csepp desztillált vízzel higítottam, majd egy csepp higított Lugol-oldatot adtam hozzá. A tárgylemez mozgatásával vagy tiszta üvegbottal a cseppeket összekevertem. Egészséges levélből vett minta esetén azonnal nagyszemcséjü csapadék vált ki, virusos esetén csak 15-3o másodperc mulva vált ki aprószemcsés, kevés csapadék.

A reakció kivitelezésénél célszerü - de kellő gyakorlat esetén már nem feltétlenül szükséges - megbizhatóan egészséges levélből vett mintával való összehasonlitás.

5.4. Kanngiesser-féle reakció. Kanngiesser /23/ növényi nukleinsavak izolálása folyamán azt találta, hogy az egészséges dohány

leveleinek présnedvéből 1o %-os NaCl hatására néhány óra mulva pelyhes csapadék válik ki, míg különböző virusokkal fertőzött dohánylevelek présnedvei napok mulva is csak gyenge zavarosodást és opalizálást mutattak.

Kanngiesser módszerét alkalmaztam egészséges és virusos sárgasággal fertőzött cukorrépalevelek présnedveire. Megállapitottam, hogy azonos térfogatu présnedv és 2o %-os NaCl-oldat egészséges levélnél néhány óra mulva erős zavarosodást, 24 óra mulva bőséges csapadékot, a csapadék felett tiszta oldatot eredményezett. A virusos levél ugyanakkor csak enyhe zavarosodást, illetve kevesebb fehérjekicsapódást és a csapadék felett tiszta oldatot mutatott /11.ábra. 7-8. kémcső/.

A reakció alkalmas egészséges és virusos sárgasággal fertőzött répalevelek közötti különbség kimutatására.

5.5. Hayem-próba. Egészséges és fertőzött présnedveket titráltam meg Hayem-oldattal. A présnedvek eredetileg is meglevő erős zavarossága és szinezettsége miatt sem a reverzibilis, sem az irreverzibilis kicsapódási pontot nem tudtam megfigyelni.

A Hayem-próbát Seitz-en szürt présnedvvel is megismételtem. 5-5 ml présnedv titrálásánál irreverzibilis kicsapódás nem mutatkozott. 2,2 ml Hayem-oldat hozzáadása után mindkét présléből vált ki csapadék, lo ml hozzáadás után 2-3 óra mulva a csapadék leülepedett /11.ábra. 9-lo.kémcső/.

5.6. Takata-Ara reakció. Védőkolloidok, elsősorban albuminok jelenlétében merkuriklorid és nátriumkarbonát oldatainak keverékéből kolloidális higanyoxid képződik, mely oldatban marad, mig a globulinfrakció megnövekedésekor csapadékos kiválás észlelhető.

Kilenc kémcsőben o,9 %-os nátriumklorid oldattal 2-512-szeres répalevél-présnedv higitást készitettem. Minden kémcsőbe azonos térfogatu Takata-Ara reagenst /fukszinnal festett merkuriklorid oldat/, valamint 1o %-os nátriumkarbonát-oldatot adtam. Alapos

összerázás után 24 órán át állni hagytam. A higitási sorozat utolsó tagjánál /512-szeres higitás/ találtam kevés, sötétvörös porszerü kiválást egészségesnél és fertőzöttnél egyaránt. A Takata-reakcióra klinikai körülmények között jellemző kicsapódást nem tapasztaltam. A kivált csapadék nem jellemző, igy a reakció a fertőzöttség kimutatására nem alkalmas.

5.7. Weltmann-féle reakció /koagulációs gyürü vizsgálata/. Kálciumklorid-oldatból higitási sorozatot készitettem o,1-1,o ezrelékig, majd minden kémcsőbe o,1 ml présnedvet adtam /14. táblázat/. Ezután a kémcsöveket 15 percre forró vizfürdőbe tettem. A levélfehérjék termolabilitása folytán minden kémcsőben csapadék vált ki. A kicsapódott fehérjék mennyisége nem volt jellemző.

5.8. Gerlóczy-féle reakció. A présnedveket kémcsövekben azonos térfogatu káliumszulfát, káliumklorid, káliumbromid, káliumjodid, káliumnitrát és káliumrodanid izotóniás oldataival elegyitettem, majd hideg vizfürdőbe állitottam. A vizfürdő hőmérsékletét percenként 3 C°-kal emeltem. 5o C° körül bőséges fehérjekicsapódás volt megfigyelhető.

A Darányi-féle kolloidlabilitási reakció és a Gerlóczy-féle reakció kivitelénél azt tapasztaltam, hogy a többórás állás után leülepedett fehérjecsapadék az oldat össztérfogatára számitva az egészségesnél 4o, a fertőzöttnél 2o térfogat-% körül volt. A levélfehérjék hőkoagulálása kb. 45 C°-nál kezdődött meg és 5o C°-nál teljessé vált. E két reakció azonos eredménye alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a fellépő különbségek nem az egyes reagensek fajlagos vagy kevésbé fajlagos hatására jöttek létre, hanem a fehérjék termolabilitásán és mennyiségi eltérésein alapulnak.

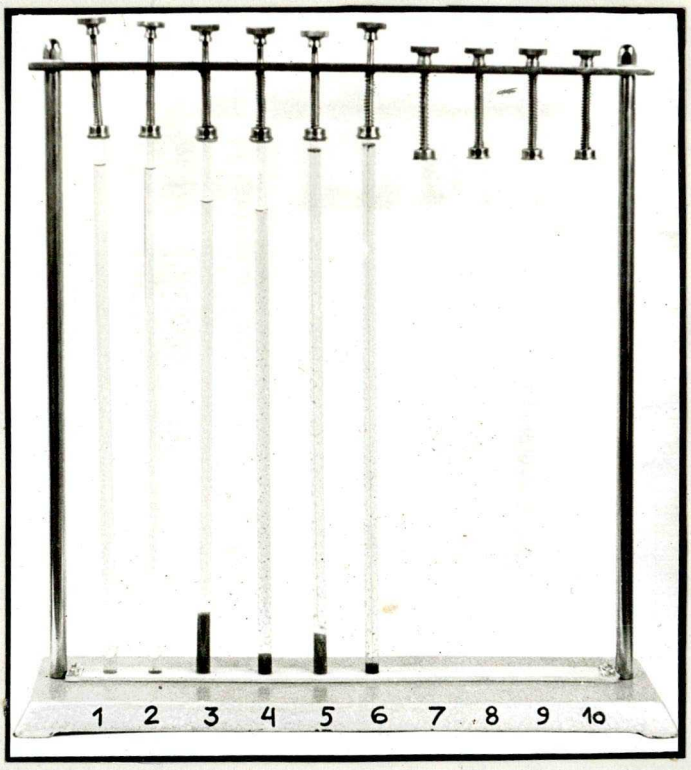
A cukorrépalevél présnedv esetén az „izotóniás-oldat" kifejezés azonos az ismert izotóniás-oldattal. A vizsgált présnedvek sókoncentrációja o,9o-o,95 % NaCl-koncentrációnak felelt meg.

5.9. Kürten-féle formalin reakció. 4o %-os formaldehidet fenolftalein jelenlétében 2o %-os nátriumkarbonát-oldattal semlegesi-

tettem. 1 ml semlegesitett formaldehid oldatot cseppenként adtam 2 ml frissen centrifugált levél-présnedvhez. A formaldehid hozzáadása alatt az oldatok nem változtak meg, de 3 órás állás után az egészséges levél présnedve a kémcsőből ki sem volt önthető az erős fehérjekicsapódás miatt, mig a fertőzött présnedv folyékony maradt.

5.1o. Cinkszulfát-próba /Kunkel/. A présnedvekhez adott cinkszulfát-veronál reagens még 24 óra mulva sem mutatott zavarosodást. Ennek oka valószinüleg az előirás szerinti nagy higitás volt.

A kolloidlabilitási reakciókat a vörös vérsejtek süllyedési sebességének meghatározására használatos Westergreen-féle módszerhez hasonlóan is fel lehet használni a virusos fertőzöttség kimutatására:



12.ábra. Kolloidlabilitási reakciók Westergreen-pipettákban: 1-2. Vizpróba; 3-4. Lugol-oldat; 5-6. Daránvi-féle reakció. 1, 3, 5: egészséges, 2, 4, 6: virusos présnedv.

Az eredeti Westergreen-pipetták ebben az esetben nem alkalmazhatók, mert a pipetták kis átmérője miatt a pelyhesen kiváló fehérjecsapadék a pipetta falára tapad és nem süllyed le. Kísérleteimben ezért 4 mm belső átmérőjű üvegcsöveket használtam.

5.11. Fehérjekicsapási reakciók. Kísérleteimet kiterjesztettem néhány, általánosan használatos fehérjekicsapó reagens alkalmazhatóságának vizsgálatára is.

A reakciókat 1-3 ml-nyi présnedvvel végeztem. A kísérletek tájékoztató jellegűek voltak és a kolloidlabilitási reakciók alátámasztására szolgáltak.

A reagensek hozzáadása után 5-10 másodperc mulva a következőket figyeltem meg:

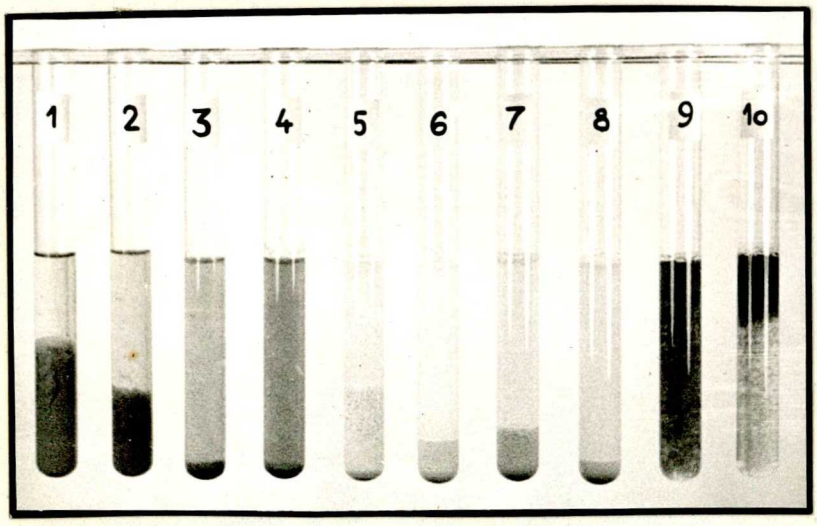
etilalkohol /13.ábra. 1. és 2./
egészséges: erős zavarosodás, a csapadék gyorsan ülepedett,
virusos: erős opalizálás, majd lassu ülepedés;

triklórecetsav /13.ábra. 3. és 4./
egészséges: erős zavarosodás, de a csapadék nem ülepedik,
virusos: opalizálás, igen kevés csapadék;

foszforwolframsav /13.ábra. 5. és 6./
egészséges: igen gyorsan ülepedő, sok csapadék,
virusos: igen gyorsan ülepedő, kevesebb csapadék;

ólomnitrát /13.ábra. 7. és 8./
egészséges: azonnal ülepedő csapadék;
virusos:

ammoniumszulfát /13.ábra. 9. és 10./
egészséges: mérsékelt opalizálás,
virusos: igen gyenge opalizálás.



13.ábra. Fehérjekicsapási reakciók.

A 13.ábra az öt fehérjekicsapási reakció eredményét mutatja a reagensek hozzáadásától számított 5-10 perc mulva.

Az egészséges és virusos sárgasággal fertőzött cukorrépalevelek présnedvei valóban eltérő viselkedést mutattak az elvégzett kolloidlabilitási és fehérjekicsapási-reakciók nagy részénél. Azonban tapasztalataim ellentétben álltak azzal, ami a kolloidlabilitási-próbák eredeti leirása alapján várható volt. A klinikai vizsgálatoknál kóros esetekben növekedik a fehérjetartalom, ezzel szemben kisérleteimben a virusos fertőzés jóval kisebb fehérjemennyiséget mutatott az egészségeshez viszonyitva. Ennek a különbségnek elvileg több oka lehetséges, melyek külön-külön vagy együttesen léphetnek fel:

1. Fertőzöttség esetén valóban csökken az összfehérjetartalom; ezt bizonyitják az összfehérje-meghatározások is.

2. Fertőzöttség esetén az egészséges növényekre jellemző leglabilisabb fehérjefrakció, a γ-globulin mennyisége jelentősen csökken. Ezt bizonyitják az elektroferogrammok és a kálimfoszfátos frakcionálás kisózási görbéi is. A fertőzött növények γ-globulinjának csökkenése jut kifejezésre a kisebb összfehérjetartalomban.

3. Az egészséges levélben a védőkolloidhatást kifejtő albuminfrakció mennyisége kisebb - hacsak viszonylagosan is - , vagy védőhatását labilitása csökkentette.

4. A virusfehérje védőkolloidként szerepel.

A kisérleteknél a virusos sárgasággal fertőzött levél présnedvéből is jelentékeny mennyiségü fehérje csapódott ki. Ez a tény azt jelenti, hogy a fertőzés hatására nemcsak a globulinok mennyisége nem növekedett, hanem a kisérletek erőteljes körülményei között a kevésbé labilis albuminok is kicsapódtak termolabilitásuk és a reagensekkel szembeni érzékenységük miatt.

A kisérleti adatok alapján a 3. és 4. pontban emlitett okok még nincsenek bizonyitva, sőt feltételezésük is valószinütlennek látszik.

6. Diagnosztikai immunszérő előállitása és in vitro vizsgálata.

Az immunológiai módszerek az antigének és fajlagos antitestjeik közötti reakción alapulnak. Antigéneknek nevezzük azokat a nagymolekulasulyu vegyületeket, melyek parenterálisan az állati szervezetbe jutva ellenanyag /antitest/ termelést inditanak meg. Az antigének általában fehérjék és az ellenanyagtermelő szervezetben normális körülmények között nem találhatók meg. Fajlagosságukat kémiai szerkezetük határozza meg. Az antitestek a megfelelő antigén hatására - természetes vagy mesterséges fertőzés következtében - keletkező anomális, módositott szérumglobulinok és rendszerint a γ-globulinfrakcióban találhatók meg.

Ha egy állat patogén anyaggal /baktériummal vagy virussal/ fertőződik, a fertőzés hatására a véráramban antitest-fehérjék jelennek meg, melyek specifikusan reagálhatnak a baktériummal vagy virussal. Az antitest képzésével védekezik az állat a fertőzés ellen. A szérum, melyet egy állatból nyerünk, kimutathatóan tartalmazza az antitest-fehérjét, mivel meg van az a tulajdonsága, hogy in vitro is képes egyesülni a fertőzést okozó baktériummal vagy virussal. Az egyesülésnek az a ténye - mely

többféleképpen is kimutatható - az alapja a szerológiai próbáknak. Az antitesteket sok idővel azután is ki lehet mutatni az állat szöveteiben vagy vérében, amikor a betegség már régen lezajlott, és további védelmet nyujtanak ugyanazzal a baktériummal vagy virussal szemben.

Az állat nemcsak betegséget okozó anyaggal szemben fog antitesteket képezni, hanem általában olyan antigénekkel szemben is, melyek az antitestet termelő állattal szemben "fajidegen" vegyületek.

Az antitestek kimutatására a vérből készült vérsavót használjuk fel. Az antitesteket tartalmazó szérum az antiszérum vagy immunsavó.

Az antigén-antitest reakció in vivo és in vitro figyelhető meg. Annak ellenére, hogy az in vivo módszerek sokkal érzékenyebbek, mégis az in vitro végrehajtott kisérletek alkalmasabbak gyakorlati célokra.

Az antigének és antitestek in vitro viselkedésével a szerológia foglalkozik. A szerológiai reakciók fontos tulajdonságai nagy fajlagosságuk és érzékenységük. Közel rokon anyagok akkor is megkülönböztethetők ezzel a módszerrel, ha azok azonosaknak is látszanak minden más felhasználható próbával. A reakció alapja a fajlagos kombinálódás az antitestfehérje és az antigénrészecske vagy molekula között. Megfelelő antiszérumokkal latens fertőzések is kimutathatók.

Az antigén és antitest közötti reakciót különböző utakon tehetjük megfigyelhetővé. A legegyszerübb próba a kombinálódott antigén és antitestfehérje között látható csapadék képződése. Az elterjedten használt precipitin- és agglutinin-próbáknál az antigén és antitest összekeverését az oldhatatlan antigén-antitest-komplex kicsapódása követi.

Az antigén és antitest egyesülésekor két egymást követő jelenség zajlik le. Az első fázis szigoruan fajlagos, az antigén és

antitest kémiai erők hatására gyorsan egyesül. Ezt a nem látható egyesülést követi a második fázisban egy nem-fajlagos folyamat, mely fizikai erők hatására kolloidkémiai uton jön létre.

Egyesüléskor az antitest csökkenti az antigén negativ elektromos töltését és szemmel is látható kicsapódás észlelhető, ha az antigén-antitest-komplex töltése eléri a reá nézve kritikus feszültséget. Ha a reakcióban résztvevő egyik partner koncentrációja nagyon alacsony, közvetlenül látható reakció nem megy végbe. Ilyen esetekben az antigén-antitest-komplex jelenléte elektronmikroszkóppal mutatható ki.

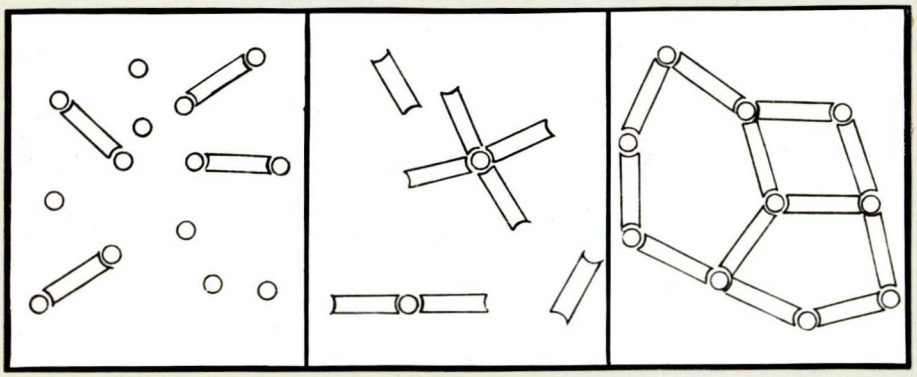
A szerológiában legáltalánosabban a precipitin-tipusu reakciókat használják viszonylagos egyszerüségük miatt. A precipitinreakciók azzal a ténnyel jellemezhetők, hogy kötésképződés folytán antigén-antitest-komplexből álló csapadék keletkezik.

Az antigén fajtájától /eredetétől/ függően kétféle csapadékképződést különböztethetünk meg. Az ostoros baktériumok antigénjeihez /H antigén, flagelláris antigén/ hasonlóan a bot- és fonálalaku növényi virusok is pelyhes csapadékot adnak antiszérumjaikkal. A szférikus /globuláris/ növényi virusok pedig a nemmozgó baktériumokhoz /O antigén, szomatikus antigén/ hasonlóan tömör, szemcsés csapadékot eredményeznek.

Mint minden analitikai módszernél, itt is szükség van a reagáló anyagoknak egy minimális mennyiségére, mely a pozitiv reakcióhoz szükséges. Az antitesteket tartalmazó antiszérumoknál ezt a minimális mennyiséget titernek nevezik, meghatározva ezzel az antiszérum végső higitását, mely még látható reakciót ad az antigénnel. Az antigén esetében ezt a végső higitást higitási végpontnak nevezik.

Az oldhatatlan antigén-antitest-komplexek képződésére többféle magyarázat van. Egy elmélet értelmében az antigén és antitest kölcsönös kapcsolódása a molekulájukon lévő poláros csoportok közötti reakciónak tulajdonitható. A poláros csoportok száma határozza meg egy anyag hidratációs fokát és ennél fogva oldó-

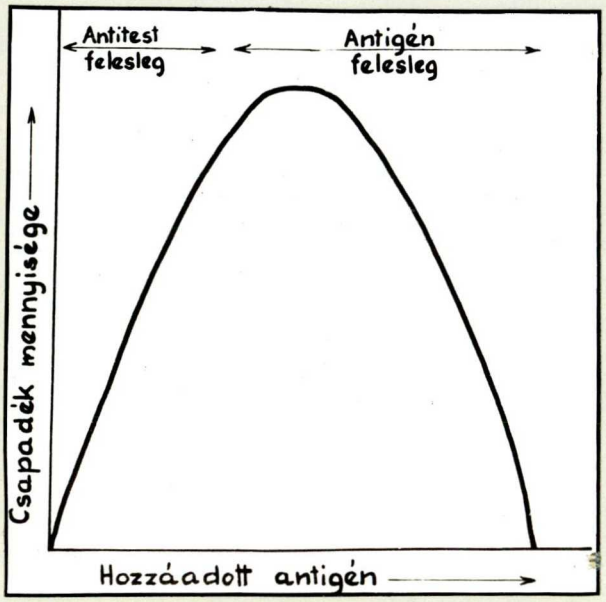
konyságát. Ha a poláros csoportok száma csökken - és ez megy végbe, ha antigén reagál antitesttel -, a képződött komplex ki fog csapódni. Azonban nem csak ez az egyetlen meghatározó tényező, hanem a komplex mérete az egyes reagáló anyagokhoz viszonyítva is fontos.



14.ábra. Antigén-antitest reakciók. a./ Oldható komplex, melyben az antigén van feleslegben; b./ oldható komplex, melyben az antitest van feleslegben; c./ oldhatatlan antigén-antitest-komplex. Antigén O , antitest ⊃⊂.

A 14.ábra /9/ vázlatosan mutatja a különböző lehetséges eseteket a reakcióban résztvevő anyagok mennyiségével kapcsolatban. Akár az antigén, akár az antitest van feleslegben, a komplex egy része oldatban marad. Ezen az alapon érthető, hogy az antigén és antitest aránya jelentősen változhat a csapadékon belül.

Ha a csapadék mennyiségét ábrázoljuk az antigén különböző koncentrációival szemben, a 15.ábrán látható görbét kapjuk /4/:



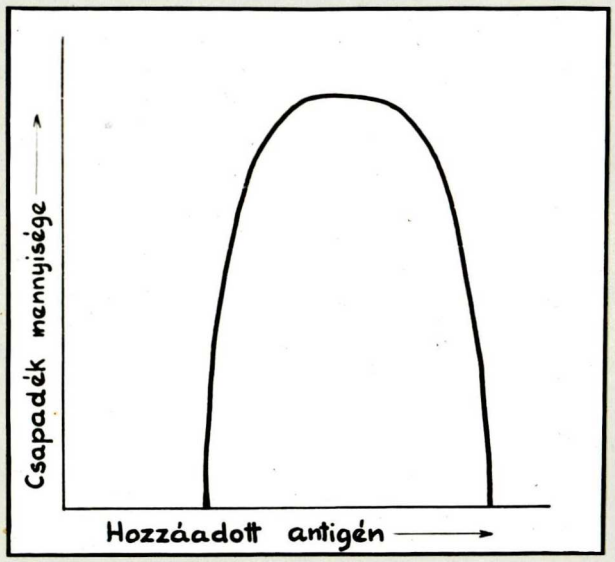
15.ábra. Precipitációs görbe.

A görbén három zónát különböztethetünk meg:

az antigén-felesleg zónáját,
az antitest-felesleg zónáját és köztük
az antigén és antitest ekvivalencia zónáját.

Jelentékeny antigén-felesleg esetén a kicsapódás nem megy végbe. A legtöbb csapadék az ekvivalencia-zónában és az antigén-felesleg zónájának vele szomszédos részében képződik.

Lovaktól származó antiszérumok gyakran teljesen eltérő képet mutatnak. Csapadék nem képződik sem antigén, sem antitestfeleslegben /pl. diftéria antiszérum, stb./:



16.ábra. Precipitációs görbe lószérum esetén /4/.

Erre a reakcióra jellemző, hogy a csapadékképződés speciális zónában megy végbe. Boyd /4/ szerint ezt a jelenséget feltételezhetően a lószérumban jelenlévő inkomplett antitestek okozzák.

Ennél fogva nyilvánvaló, hogy a fentebb leirt jelenségek ismeretében minden precipitin-próbánál különböző koncentrációju antigénnel és antitesttel szükséges dolgozni.

Az antigén és antitest-koncentrációnak hatásától eltekintve, a precipitin-reakció eredményét egyes más tényezők is befolyásolják, igy például elektrolitek jelenléte, pH és hőmérséklet.

Általában o,9 %-os /izotóniás/ NaCl-oldatot használnak higitások készitésére. Magas sókoncentrációju oldatokban a csapadék feloldódik az antigén-antitest-komplex disszociációja miatt. A növényi virus-szerológiában az alacsony sókoncentráció hajlamos elősegiteni nem specifikus csapadékok képződését.

5-8 pH között a csapadék mennyisége közelitőleg állandó, azonban néhány esetben az antigén tulajdonságai e tartományon belül kismértékben megváltoztak.

A hőmérséklet hatását tekintve o-37 C° között ugyanannyi csapadék képződik. A fehérjék kritikus határáig felemelt magasabb hőmérséklet felhasználható a csapadékképződés meggyorsitására.

Növényi virusok antiszérumainak előállitására tengerimalacot, szárnyasokat is használnak, de a nyul látszik a legkényelmesebb és legtöbbet használt kisérleti állatnak. Az irodalom mindössze egy esetben emliti ló felhasználását immunsavó előállitására a burgonya X-virus diagnosztizálásához /4o/.

A cukorrépa virusos sárgaságának kimutatásához az antiszérumokat többféle módon lehet előállitani. Felhasználták például a nyers préснedvet centrifugálás után /26,33/, vagy a triklórecetsavas kicsapással feldusitott levélfehérjét nyulak immunizálására /21,22/.

Intézetemnél már több éve használják a répalevél centrifugált présnedvét immunsavó nyulból történő előállitására. Ez a savó azonban nem mutatta ki megbizhatóan a fertőzést. Több kisérletsorozatomban a virusos sárgaság minden tünetét mutató leveleknél a szerológiai reakció 85,5 %-ban volt pozitiv, 14,5 %-ban negativ; teljesen egészségesnek látszó, tünetmentes leveleknél 5o-5o %-ban kaptam pozitiv és negativ eredményt. Ez a megállapitás egyezik az irodalomban már közölt adatokkal /21,28/.

Kétségtelen, hogy nyulakat kényelmes és egyszerű felhasználni immunsavó előállitására, ha azonban nagyobb mennyiségü szérumra van szükség, az állatot el kell véreztetni, vagy több állatot kell felhasználni.

Ilyen meggondolás alapján választottam lovat kisérleti állatként immunsavó előállitására. A lovak általában nyugodtan türik az infuzióval és vérvétellel kapcsolatos müveleteket és a nyert szérum mennyisége aránytalanul több, mintha más, kisebb állatot használnánk. Az infuziókat és vérvételeket állatorvos végezte.

Az immunsavó előállitás folyamán többször vettünk vért, virusos levélplazmát kétszer infundáltunk, precipitációs reakciókat és immunszérum-elektroforézist végeztünk.

Az elvégzett müveleteket az alábbi táblázat foglalja össze:

6.táblázat.

Kisérleti nap	Vérvétel	Antigén infuzió	Precipitin-reakció	Szérum elektroforézis
1.	1.	1.		1.
9.	2.		1.	2.
1o.		2.		
13.	3.			3.
16.	4.		2.	4.
25.	5.		3.	5.

Az immunizáláshoz szükséges szürt levélplazmát a kisérleti rész 1.2. pontban leirtak szerint készitettem. Szürés után a présnedv pH-ja 6,25 volt, fajlagos ellenállása / ϱ / 46,8 ohm. A szürt plazma alkalmazása célszerübbnek látszott akár az alakos sejtelemeket tartalmazó nyers présnedv, akár a dusitott fehérje alkalmazásánál, mert az egyébként antigénként is szereplő sejtalkotórészek igy nem kerültek a véráramba és nem képződtek felesleges, esetleg zavaró ellenanyagok.

A plazma infundálása előtt a lóból vérmintát vettünk. A vért alvadás után 5 percig centrifugáltam /55oo g gyorsulással/. Az így nyert kezeletlen szérum pH-ja 7,9, fajlagos ellenállása 88,5 ohm volt. Ezt a kezeletlen szérumot a kisérleti részben leirtak szerint /3.1.-3.4./ papirelektroforézissel is vizsgáltam.

A vérvétel után nyakvénába infundáltunk 5oo ml szürt levélplazmát. Körülbelül egy óra mulva az állaton sulyos allergiás sokk tünetei mutatkoztak. Az állat nyugtalan lett, egész testét nagyobb kiterjedésü /5-lo cm átmérőjü/ vizenyős beszürődések boritották, lélegzése nehézzé vált. Rövid idő mulva összeesett, hasmenés, erős izzadás, lélegzése 5 másodpercenként egy-egy hördülés volt. 3,5 óra mulva a kórkép javult: a vizenyős beszürődések néhány perc alatt felszivódtak, a gégevizenyő felszivódásával és a hörgőcskék sima izomelemei görcsének feloldódásával a lélegzés erősödött. Utókezelésként 4,5 óra mulva a sóveszteség pótlására intravénásan 2oo ml kálciumklorid-oldatot, 5oo ml 5 %-os szőlőcukoroldatot és 5 g koffeint adtunk, 7 óra mulva a felszabadult hisztamin megkötésére loo tabletta Dehistin-t perorálisan. lo liter viz itatása után az állat magától felállt.

A 9.napon vért vettünk. A lecentrifugált szérum pH 7,7, ϱ =llo ohm. Papirelektroferogrammját a 24/b. ábra mutatja.

A szérummal végrehajtott precipitációs-próba egészséges és virusos levélplazma között nem mutatott mennyiségi különbséget. Ezért a virusos plazma infuzióját megismételtük.

A tizedik napon frissen készitett, virusos, szürt préslé pH-ja 6,2, ϱ = 65 ohm. A pH-t szilárd $NaHCO_3$ hozzáadásával 7,7-re állitottam, majd a szérummal közel azonos sókoncentráció elérésére 5 %-os szőlőcukoroldattal kétszeresére higitottam. Ebből az oldatból infundáltunk először 2o ml-t /= lo ml virusos plazma/. Miután egy óra mulva sem léptek fel allergiás tünetek, infundáltuk a higitott plazma többi részét is /18o ml/. 4o perc mulva az állat elbágyadt, lefeküdt, de a fejét fenntartotta. Később erős izzadás és hasmenés lépett fel. A kezelés folyamán

vizenyős beszürődések nem keletkeztek. Két óra mulva az állat felállt és evett.

A kisérlet folyamán további infuziót nem végeztünk.

A precipitin-reakció kivitelezésénél Seitz-en szürt egészséges és virusos présnedvet /antigén/ higitottam fiziológiás NaCl-oldattal 1:1 - 1:256 koncentrációig, a centrifugált lószérumot /antitest/ 1:1 - 1:64 koncentrációig. Az antigén higitási sorozat minden tagjának 2 ml-éhez az antitest-sorozat minden tagjának 2 ml-ét adtam. A kisérletet azért végeztem mindkét reagens különböző koncentrációival, hogy elkerüljem a csapadék nem-képződésének lehetőségét, mely az antigén vagy antitest feleslegének következménye. Alapos összerázás után a keveréket 37 C°-os vizfürdőben inkubáltam.

Az antigén és antitest elegyitésekor - elsősorban a magasabb koncentrációknál - azonnal csapadék képződött. Igy azt a meghatározási módszert, mely a látható csapadékképződés idejének mérésén alapul, nem alkalmazhattam. Irodalmi adatok szerint is az antigén és antitest kombinálódása másodpercek vagy percek alatt lezajlik. A komplex képződésének sebessége a hőmérséklettől alig függ: 0 C°-on percek alatt, 37 C°-on azonnal megfigyelhető a csapadék leválása.

A pelyhes csapadék a hosszu, botalaku antigén részecskékre volt jellemző /M-tipusu precipitáció/.

3 órás inkubálás után a kémcsövek tartalmát jeges vizzel 10 C°-ra hütöttem és a csapadék mennyiségét Pulfrich-fotométerrel nefelometriásan mértem.

Kolloidoldatokban a Tyndall-fény intenzitása /I/ Rayleigh törvénye alapján:

$$I = I_0 . k \frac{n . v^2}{\lambda^4},$$

ahol I_0 a megvilágitó fény intenzitását, k arányossági tényezőt, n az oldat egységnyi térfogatában lévő részecskék számát,

v a részecskék térfogatát és λ a megvilágító fény hullámhosszát jelenti. A nefelometriás mérések során I_o, λ és k állandó volt. A fényforrás feszültségét stabilizáltam, a használt 5300 Å hullámhosszuságu szürő /L_2/ biztositotta az abszolutmérésekhez is szükséges hullámhosszat, a komplex-részecskék térfogatát pedig állandónak tételeztem fel. Ebben az esetben a Tyndall-fény intenzitása, azaz az oldat zavarossága csak a részecskék számától függ:

$$I = n \cdot \text{konstans.}$$

Az abszolut zavarosságot /T/ az alábbi képlettel számitottam:

$$T = \text{relativ zavarosság} \cdot \frac{t}{H},$$

ahol t és H a fotométerhez tartozó zavaros test abszolut, illetve relativ zavarossága /5300 Å hullámhosszu fénynél mérve/. Mivel ez a két érték állandó /t = 0,0085 és H = 48/, az abszolut zavarosság

$$T = \text{relativ zavarosság} \cdot 0{,}000177.$$

A kisérleti adatok könnyebb áttekinthetősége és grafikus ábrázolhatósága miatt az abszolut zavarosság értékeit 1000-rel szoroztam.

Precipitációs reakciót végeztem a kisérlet 9., 16. és 25. napján. A 9. kisérleti napon felvett zavarossági adatokat az egészséges levélplazmával a 7. táblázat, a virusos plazmával a 8. táblázat foglalja össze. A két táblázat mérési adatait a 17. és 18. ábrán ábrázoltam. A 16. és 25. kisérleti napon e-

gészséges plazmával felvett adatokat a 9. és 11. táblázat, a virusos plazmával felvett adatokat 1o. és 12. táblázat tartalmazza. Ezeknek a táblázatoknak az adatait a 19., 2o., 21. és 22. ábra mutatja grafikusán.

A 9. és 16.napon egészséges levélplazmával mért precipitációs görbék lefutása teljesen hasonló. Meglepő módon nem a várt görbealakokat /15. és 16.ábra/ kaptam. A görbék maximumai mindkét esetben két sorozatra bonthatók /17. és 19.ábra/. Az antiszérum higitásával a zavarosság kezdetben csökken, majd növekszik. Feltételezésem szerint a növekvő szérumhigitással természetszerüen csökken a kicsapódott antigén-antitest-komplex mennyisége. A precipitációs reakcióban ebben az esetben a szérum inkomplett antitestjei vesznek részt, a higitással továbbnövekvő zavarosságot pedig a komplett antitestek okozzák. A komplett és inkomplett antitestek között versengés lép fel az egészséges plazma antigénjeivel szemben. A magasabb antitestkoncentrációknál az inkomplett antitest és az antigén reakciója dominál, egy egyensulyi helyzet /1:4 - 1:8 szérumhigitás között/ elérése után pedig a komplett antitest és az antigén reakciója. Érdekes jelenség még, hogy a görbék annyira el vannak tolódva az antigénfelesleg irányában, hogy a nagyobb antigénfeleslegeknél a görbék felszálló ága alig mutatkozik vagy teljesen hiányzik. Jól megfigyelhető a görbék maximumainak az antigénfelesleg irányába való fokozatos eltolódása az antitest koncentráció csökkenésével. Egészséges levélplazmával és 1:8 szérumhigitásnál a 9.napon felvett görbén két maximum van, az alacsonyabb inflexiós pontként jelentkezik. A két maximum valószinüleg az inkomplett és komplett antitestekkel végbemenő komplexképződéshez tartozik, de az antitestfelesleg irányában erősen eltolódott. A kicsapódott antigén-antitest-komplex mennyisége a 16. napon csak jelentéktelen mértékben több, mint a 9. napon.

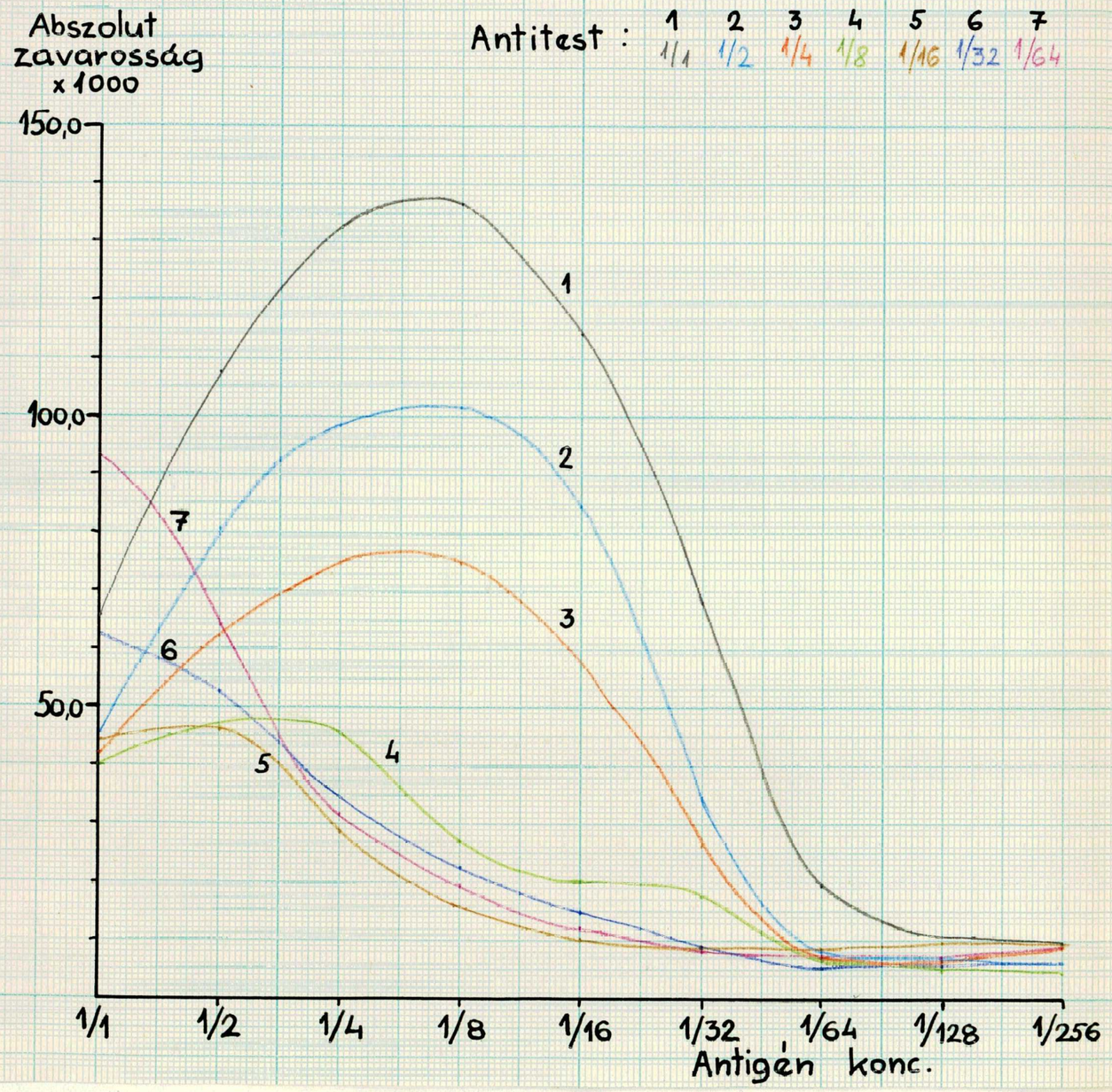
7.táblázat.

Anti-test	Antigén - higitás /egészséges/								
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
	Abszolut zavarosság x looo								
1:1	65,6	1o7,3	132,1	136,2	114,o	68,o	19,2	1o,8	9,7
1:2	45,4	8o,8	98,3	1o1,7	84,3	34,o	8,o	6,7	6,2
1:4	42,o	62,1	74,3	74,5	57,7	26,1	7,o	6,5	8,7
1:8	4o,o	46,8	45,8	27,o	2o,o	17,4	6,8	4,6	4,3
1:16	44,o	45,o	28,6	15,9	1o,1	9,1	8,9	9,7	9,5
1:32	62,3	52,6	34,3	22,4	14,8	9,1	5,3	5,9	6,2
1:64	92,4	64,o	31,6	19,o	12,1	8,o	7,2	7,2	8,7

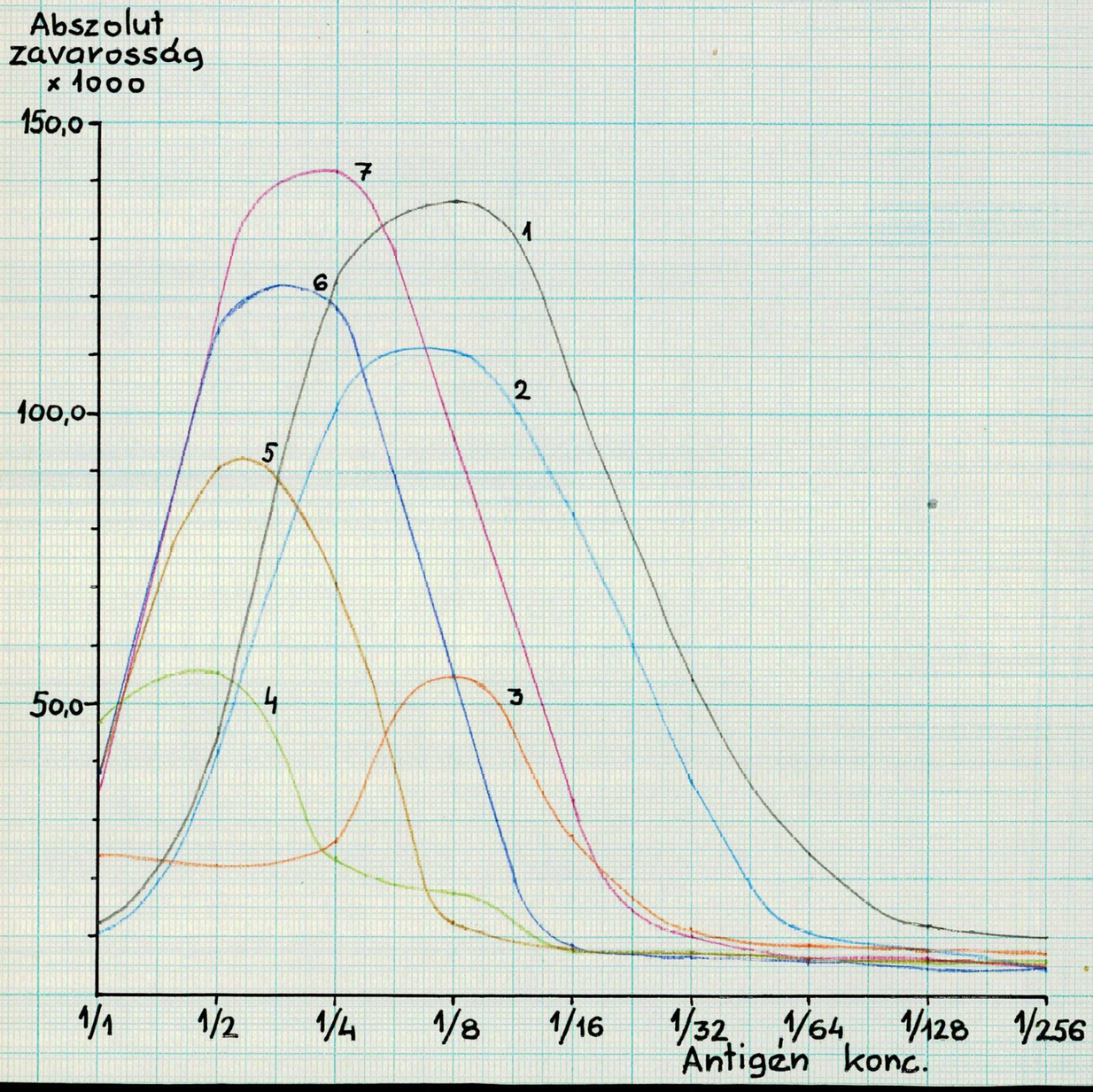
8.táblázat.

Anti-test	Antigén - higitás /virusos/								
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
	Abszolut zavarosság x looo								
1:1	12,6	44,9	122,1	136,4	1o4,1	54,o	24,2	11,9	1o,o
1:2	1o,1	41,7	1oo,6	11o,6	82,5	36,9	1o,6	7,9	5,3
1:4	23,6	22,1	26,o	54,3	27,2	11,3	8,7	7,9	7,2
1:8	46,6	55,3	23,o	17,4	7,6	7,4	6,2	5,5	5,7
1:16	38,9	9o,3	7o,8	12,9	8,o	7,4	6,2	5,8	5,6
1:32	38,1	114,2	118,o	54,6	8,5	6,6	5,7	4,4	4,4
1:64	35,4	118,1	141,6	95,7	33,4	1o,1	5,7	6,4	4,8

17. ábra. Egészséges.



18. ábra. Virusos.



17. és 18. ábra.
9. kísérleti napon felvett precipitációs görbék.

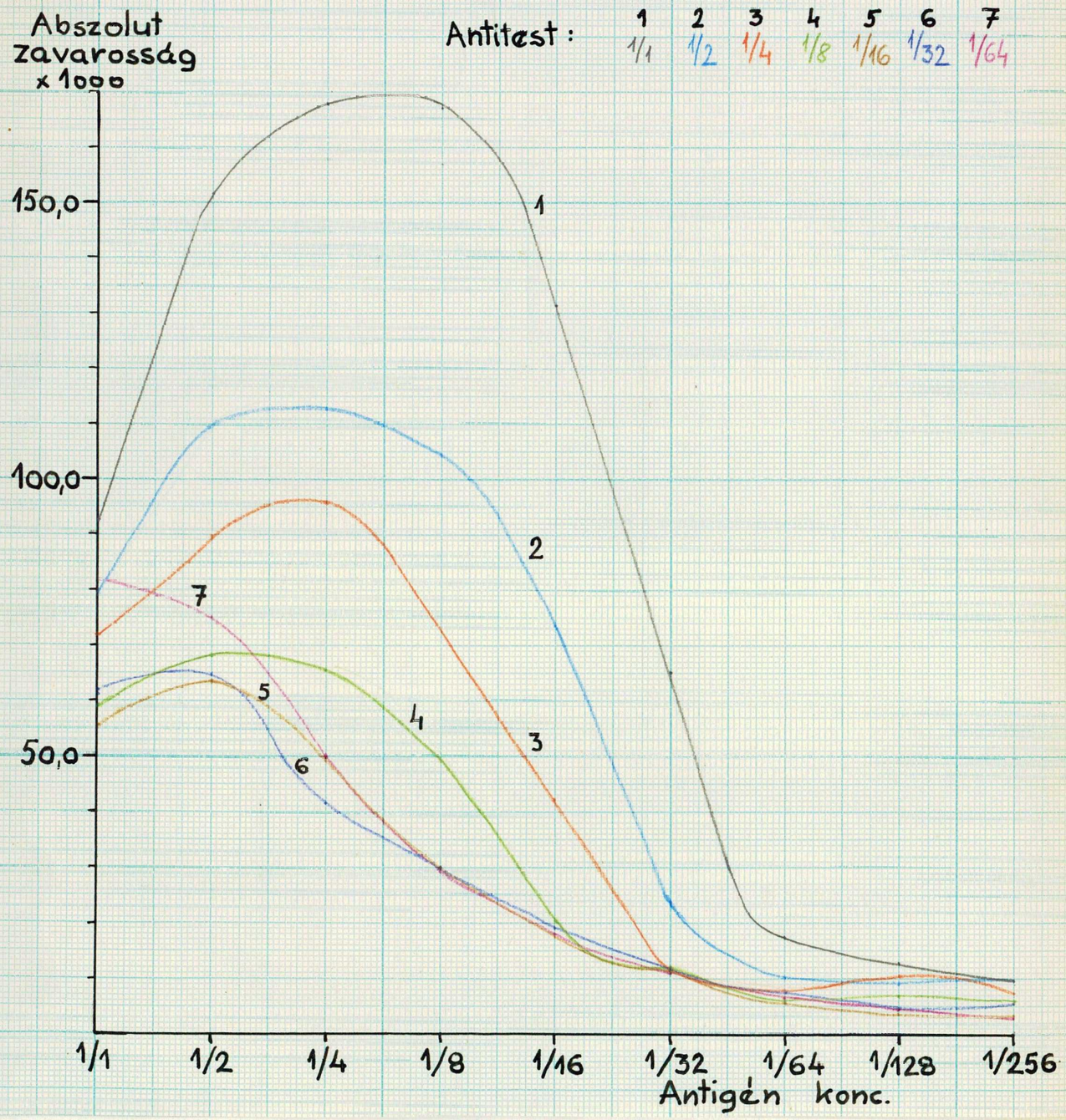
9.táblázat.

Anti-test	Antigén - higitás /egészséges/								
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
	Abszolut zavarosság x looo								
1:1	92,7	151,3	167,9	167,o	131,1	65,o	17,4	12,7	9,7
1:2	79,o	1o9,3	112,7	1o4,1	73,1	23,9	1o,1	8,9	9,7
1:4	72,o	89,4	95,5	72,3	42,1	11,5	8,o	1o,3	7,1
1:8	59,o	68,1	65,6	49,2	2o,1	11,5	6,o	6,9	5,5
1:16	55,3	63,2	49,2	3o,o	17,4	11,7	5,8	3,5	3,2
1:32	61,9	64,6	41,2	3o,o	19,o	11,5	7,6	4,6	5,3
1:64	81,9	75,o	5o,o	29,5	17,7	11,o	6,4	4,6	2,8

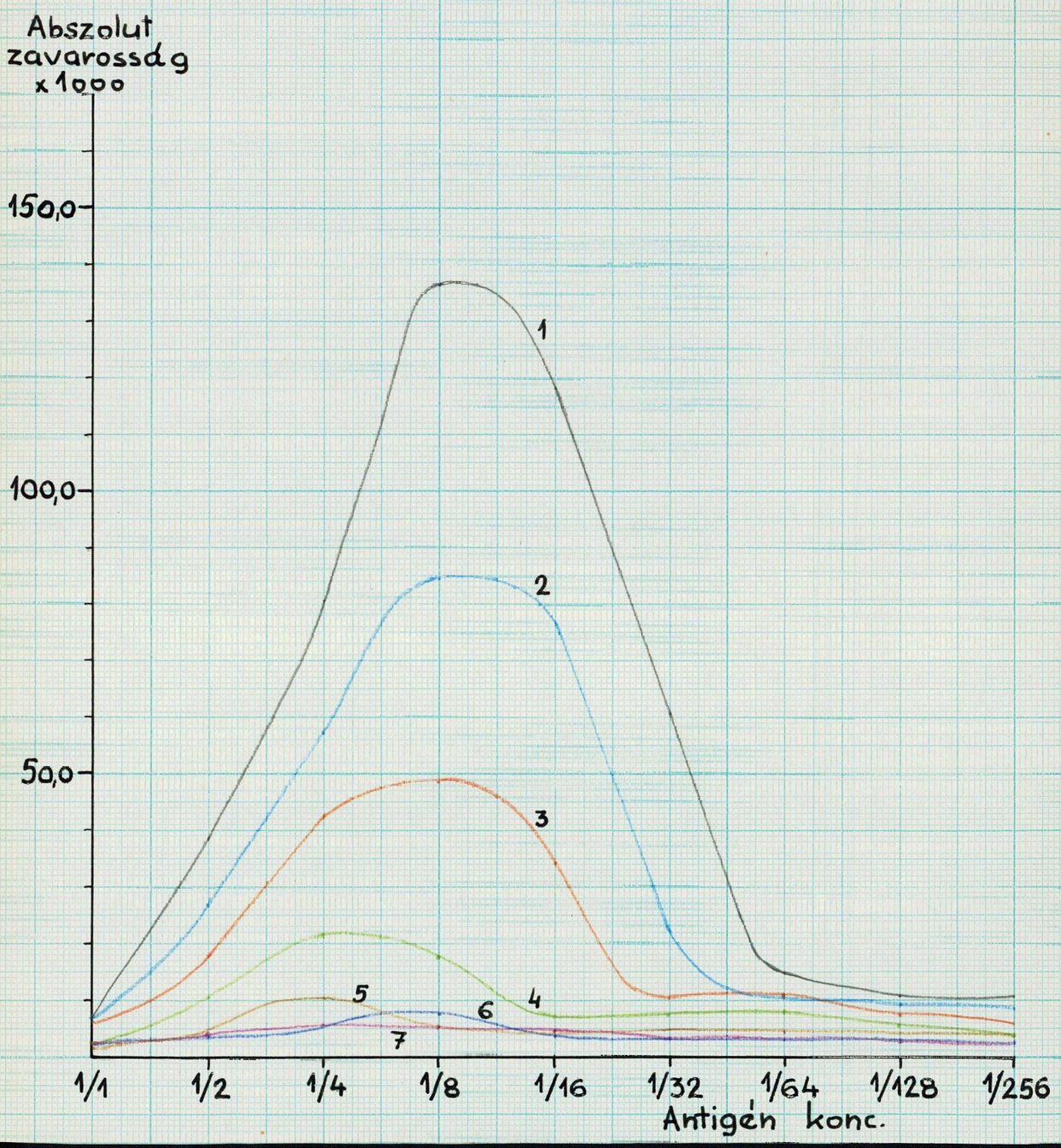
1o.táblázat.

Anti-test	Antigén - higitás /virusos/								
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
	Abszolut zavarosság x looo								
1:1	7,3	38,5	8o,5	136,2	118,o	6o,6	14,9	1o,8	1o,9
1:2	7,o	26,8	57,1	84,3	76,3	22,1	1o,6	9,o	8,5
1:4	6,2	17,7	42,3	48,6	34,o	1o,4	1o,8	7,3	6,o
1:8	2,3	1o,4	21,3	17,7	7,1	7,3	8,o	5,3	3,9
1:16	1,5	4,3	1o,3	5,7	4,4	5,o	4,6	4,1	3,9
1:32	2,1	3,7	5,1	7,3	3,7	3,2	3,o	2,8	2,3
1:64	2,1	4,4	5,7	5,5	4,1	3,2	4,3	3,o	2,8

19. ábra. Egészséges.



20. ábra. Virusos.



19. és 20.ábra.
16. kisérleti napon felvett precipitációs görbék.

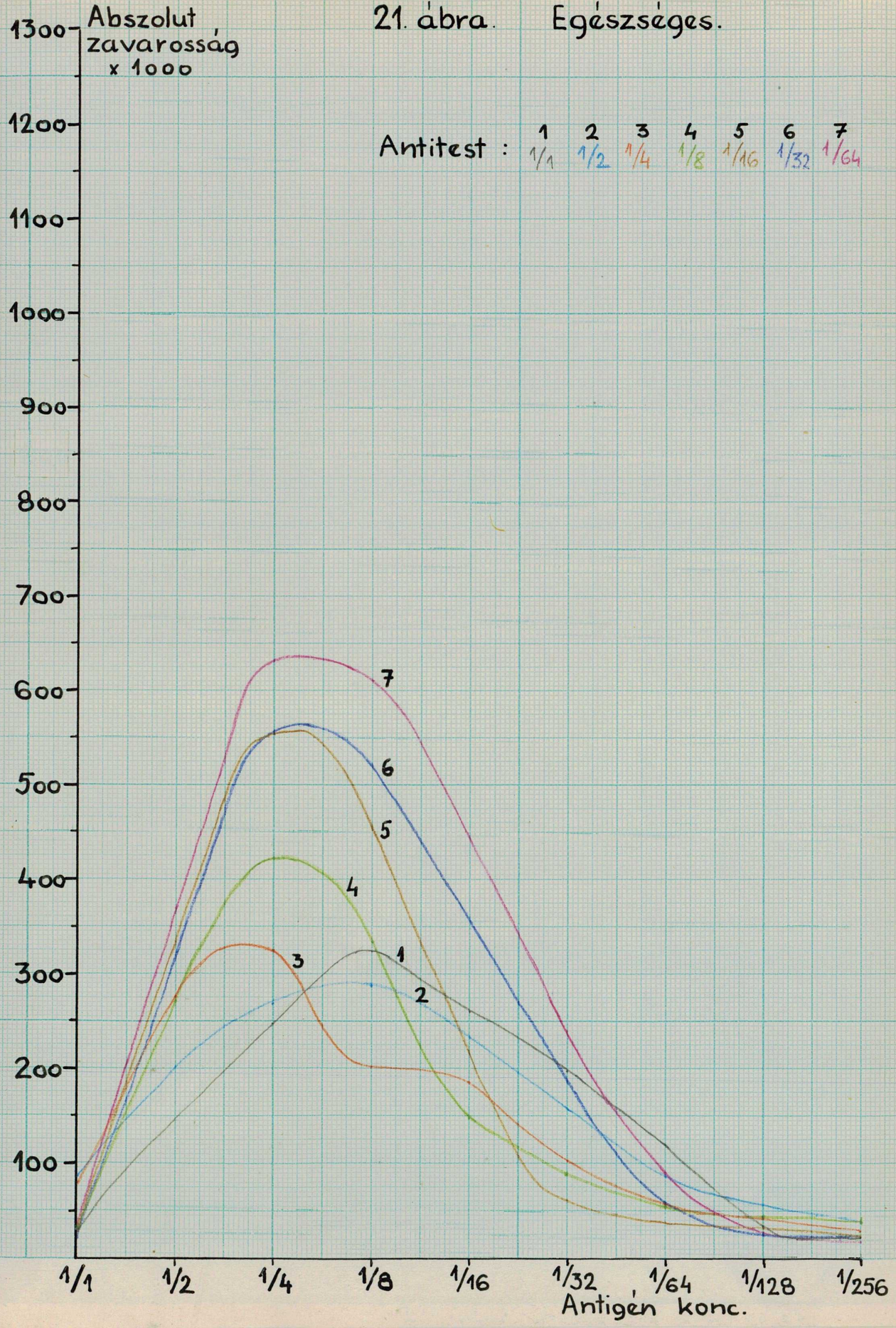
11.táblázat.

Anti-test	Antigén - higitás /egészséges/								
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
	Abszolut zavarosság x 1ooo								
1:1	3o,o	147	246	324	26o	197	119,5	34,o	2o,5
1:2	86,o	2o1	268	286	233	158	77,o	57,o	36,4
1:4	79,o	276	324	2o1	186	1o2	57,o	41,2	28,5
1:8	32,o	272	422	334	148	88	54,5	43,7	37,7
1:16	28,5	334	553	454	216	61	37,5	32,2	24,2
1:32	23,2	324	553	521	355	186	58,o	24,6	2o,7
1:64	36,o	369	632	61o	443	239	87,o	26,o	16,8

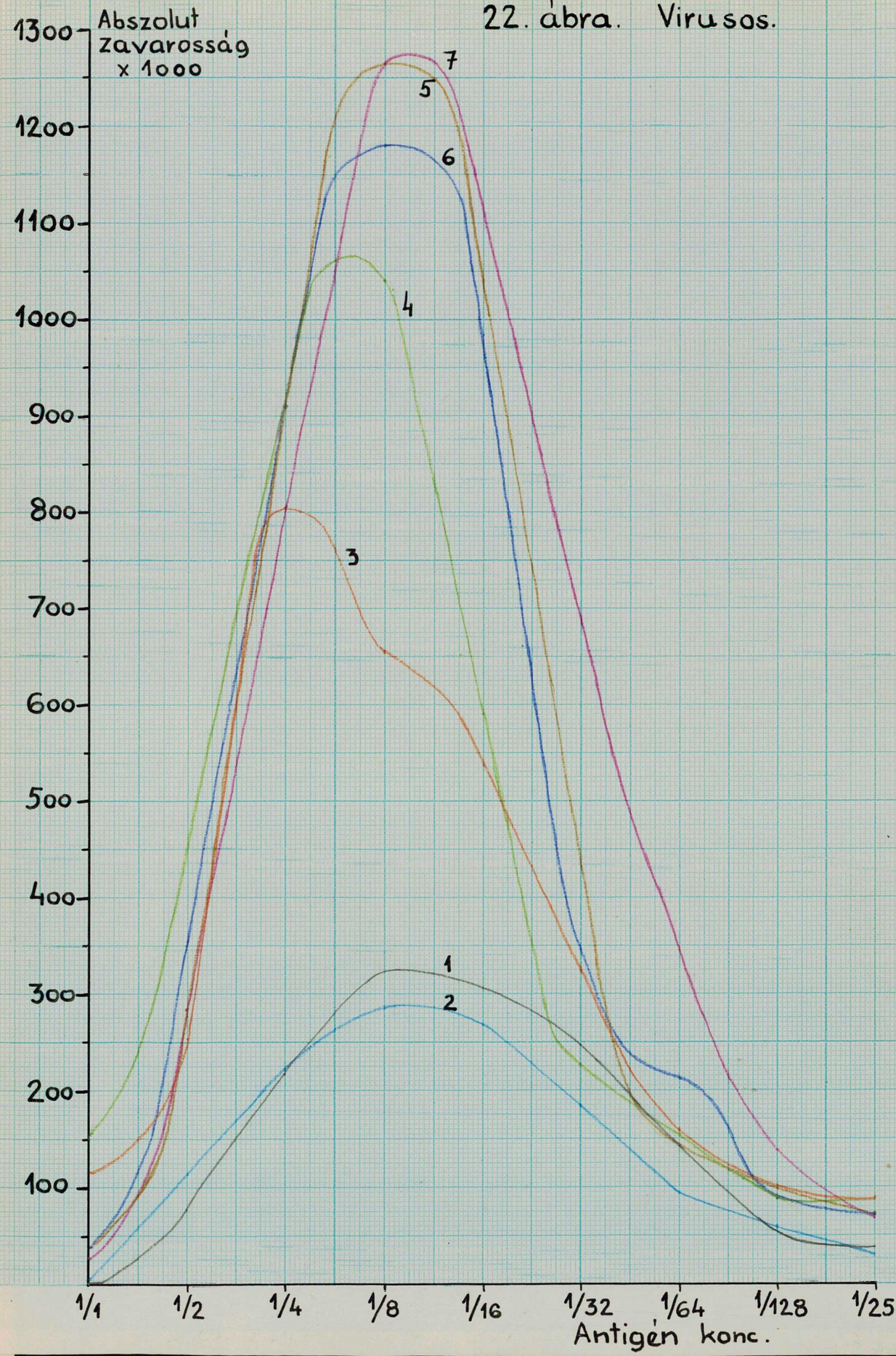
12.táblázat.

Anti-test	Antigén higitás /virusos/								
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
	Abszolut zavarosság x 1ooo								
1:1	1,o	77	216	324	3o5	246	141	54	38,1
1:2	6,7	114	221	285	268	184	94	59	3o,6
1:4	116,5	253	8o5	655	537	324	159	1o1	88,5
1:8	154,o	45o	932	1o4o	59o	227	153	91	88,5
1:16	39,3	277	9o8	1264	1o4o	432	142	99	72,5
1:32	39,2	355	9o8	118o	983	347	211	89	72,5
1:64	27,1	285	8o5	1264	11o7	682	347	138	68,2

21. ábra. Egészséges.



22. ábra. Virusos.



21. és 22. ábra.

25. kisérleti napon felvett precipitációs görbék.

Virusos levélplazmával mint antigénnel a 9. napon lényegében az egészségeséhez hasonló kettős görbesorozatot kaptam /18. ábra/, azzal a különbséggel, hogy a két görbesorozat maximumai teljesen kifejezettek, a nagyobb szérumhigitást jelentő görbék felszálló ága csaknem teljes. Az 1:8 antitesthigitás precipitációs görbéjén az inflexiós pont egybeesik az inkomplett antitesteket kifejező görbesorozat csökkenő maximumaival, a nagyobb zavarosságot jelentő maximum pedig a komplett antitestek növekvő maximumaival. Az 1:4 és 1:8 antitesthigitás görbéinek szimmetriája határozottan fejezi ki az inkomplett és komplett antitestek higitással szorosan összefüggő versengési egyensulyának valószinüségét.

A kisérlet 16. napján virusos levélplazmával végzett precipitációs reakciók görbéi /2o.ábra/ lényegesen különböznek az eddigi görbéktől. A görbék alakja megfelel az elméletileg vártnak: sem antigén-, sem antitestfeleslegben nem történik meg az antigén-antitest-komplex látható és mérhető kicsapódása. Viszont a görbék maximumai az antitest növekvő higitásával arányosan tolódnak el az antigénfelesleg irányába. Az 1:32 és 1:64 antitesthigitás görbéinek maximumai ebben az esetben nem eléggé kifejezettek ahhoz, hogy határozott következtetést lehetne levonni nagyságukból és helyzetükből. Ugy az egészséges, mint a virusos plazmával 1:4 antigénkoncentrációnál felvett görbén a 128-szoros, illetve 64-szeres antigénhigitásnál jelentkező alacsony maximumokat sem lehet értelmezni.

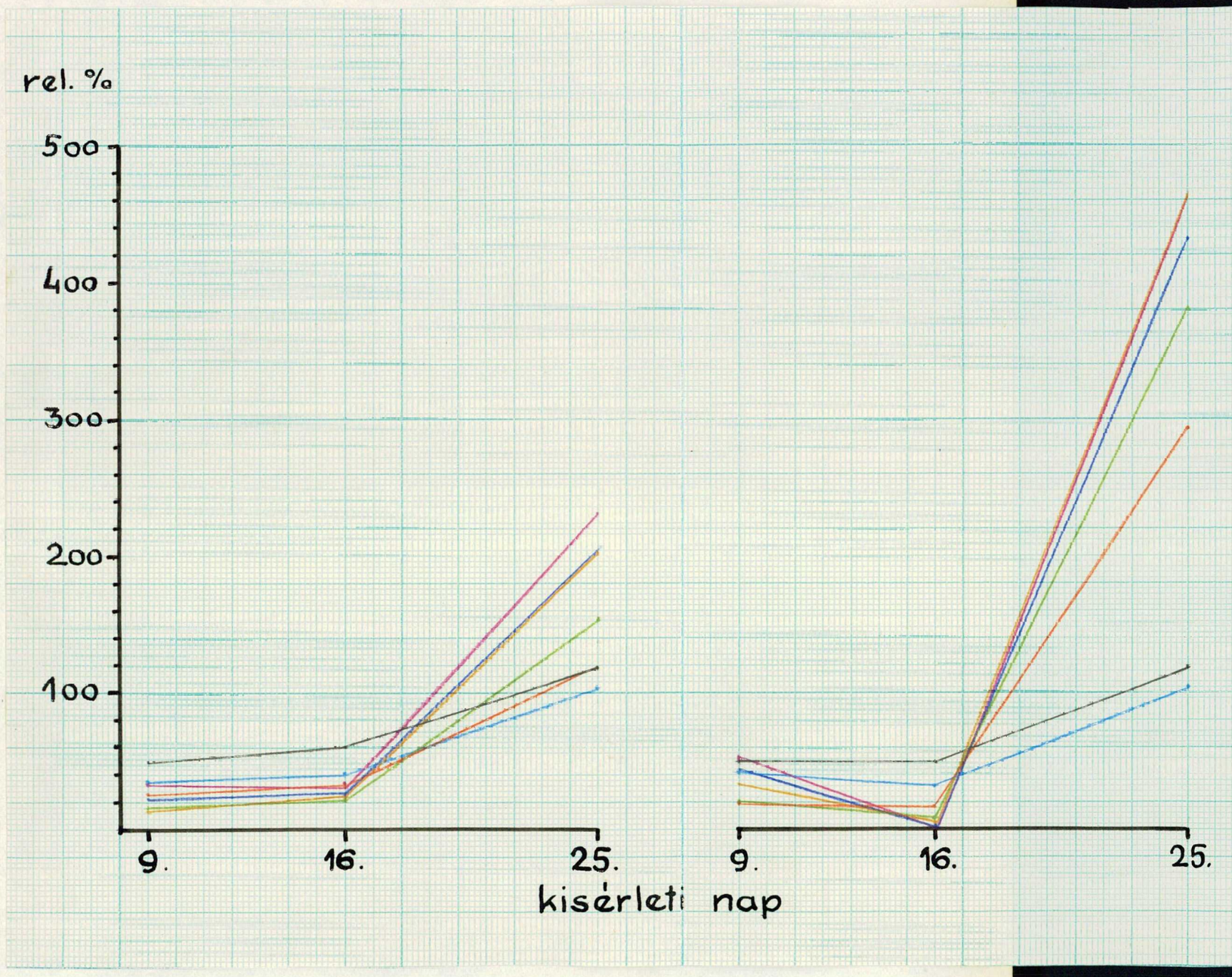
A 9. és 16. kisérleti napokon mért zavarossági adatok - és az adatokat ábrázoló görbék - alapján csak minőségi különbségek voltak kimutathatók.

Mennyiségi és minőségi különbségeket kaptam a kisérlet 25. napján végzett precipitációs reakció adataiból. Az antitestképződés lappangási időszaka hosszabb volt, mint más /nyul/ immunizálásra használt állatnál. Az immunsavó antitesttartalma ugy az egészséges, mint a virusos sárgasággal fertőzött levélplazma antigénjeivel szemben jelentősen megnövekedett. Az

előző két precipitációs reakciósorozattal szemben - ahol az egészséges és fertőzött levél antigénjei közel azonos precipitációt /zavarosságot/ mutattak - a mennyiségi különbség kétszeresre emelkedett /21. és 22.ábra/.

Az egészséges és virusos plazma precipitációs görbéi a 25. napon csaknem megközelitik az „ideális" alakot /15.ábra/. A mennyiségi különbség növekedése mellett jelentős a minőségi változás is. Az inkomplett antitest-antigén reakciósorozat maximumai a legalacsonyabbak, az eddig nyolcszoros antitesthigitásnál fellépő inflexiós pont a kisebb antigénhigitás /négyszeres/ görbéjére tolódott át. Ezenkivül még az egészséges levélplazmánál az inflexiós pont a két legmagasabb koncentrációju antitest precipitációs görbéje alatt van, a virusosnál jóval felette. Tehát az inkomplett antitestek a virusos antigénnel szemben nemcsak mennyiségileg, hanem minőségileg is jelentősen megváltoztak. A precipitációs reakcióban most már az antitestképződés lappangási ideje folyamán kialakult komplett antitestek dominálnak.

Áttekintő képet nyujt a precipitációs görbék maximumainak összefoglalása /13.táblázat/ és grafikus ábrázolása /23.ábra/. A táblázat és grafikon a kisérlet maximumainak átlagát - 273,55 - loo-nak véve tünteti fel a 9., 16. és 25. napon felvett görbék maximumainak változását. Az első két napon a maximum-értékek átlaga /29,2/ jelentősen alatta van a kisérleti átlagnak, a 25. nap maximumai felette vannak. A 25. nap adataiból kifejezett V/E értékek azt tüntetik fel, hogy az immunsavó hányszor erősebben reagál a virusos levélplazma antigénjével, mint az egészségesével.

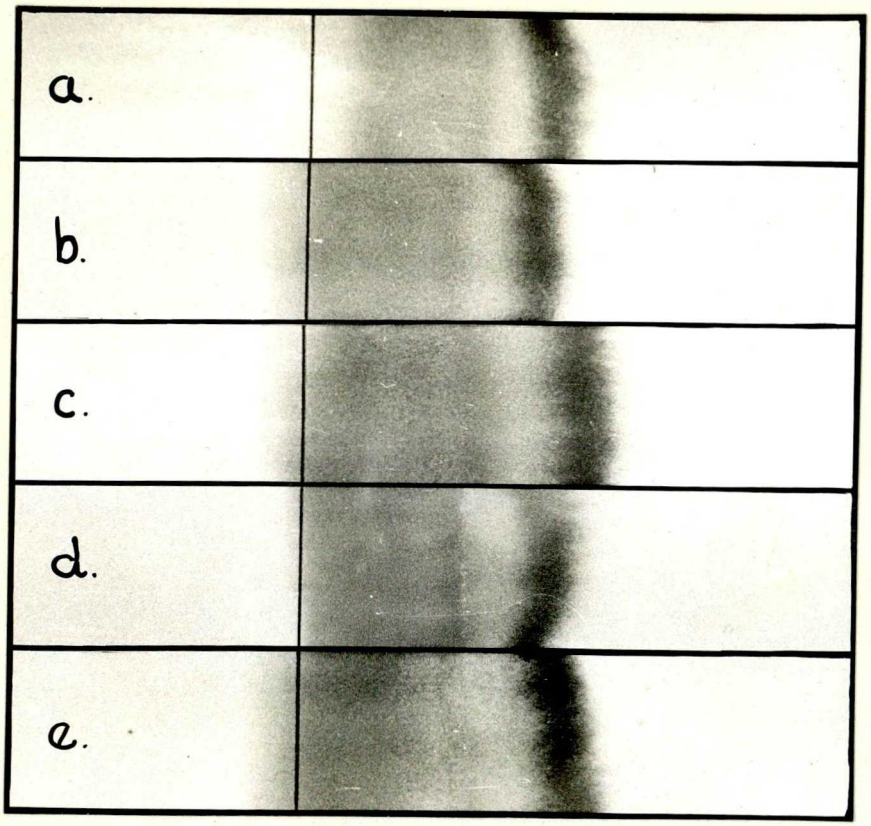


23.ábra. Antigén-antitest maximumok időfüggvénye a kisérlet átlagában.

13.táblázat.

Anti-test	9.		16.		25.		
	E	V	E	V	E	V	V/E
1:1	49,7	49,8	61,3	49,7	118,5	118,5	1,oo
1:2	37,2	4o,4	41,2	3o,8	1o3,5	1o3,o	1,oo
1:4	27,2	19,8	34,9	17,8	118,5	294,o	2,48
1:8	17,1	2o,2	24,9	7,8	154,3	38o,o	2,46
1:16	16,4	33,o	25,1	3,8	2o2,5	462,o	2,28
1:32	22,8	43,2	23,6	2,7	2o2,5	432,o	2,14
1:64	33,8	51,8	29,9	2,1	231,o	462,o	2,oo

Az állat szérumát a kisérlet 1., 9., 13., 16. és 25.napján papir-elektroforézisnek is alávetettem. Az elektroferogrammokat a 24. ábra mutatja:



24.ábra. Immunsavó elektroferogrammok.

Az első elektroferogrammot a még kezeletlen ló szérumával vettem fel /a/. A második elektroferogramm /b/ széruma azonos a 9.nap precipitációs reakciójának szérumával. A globulinok mennyisége kissé növekedett, de a precipitációs görbék /17. és 18. ábra/ szerint antitestek még nem képződtek. A 13. napon vett vér plazmájában tovább növekedtek a globulinok /c/ és várható volt a precipitációs reakció növekedése. Ezért végeztem a 16. napon ismét precipitációs próbát, melynek eredménye azonban még negativ volt. E precipitációs próbához felhasznált szérumot szintén elektroforetizáltam /d/. Ugyancsak végeztem papirelektroforézist a 25. napon pozitiv eredményt adó szérum fehérjéivel is. Ezen az elektroferogrammon /e/ a globulin és az albuminfrakció további növekedése figyelhető meg. Az elektroferogrammokat savanyu fukszinnal festettem.

7. Összefoglalás.

A cukorrépa gyökér és cukortermését jelentősen csökkenti a virusos sárgaság, mely csaknem minden földrészen elterjedt /27, 45/. A fertőzött növényekben emelkedik a légzés és csökken az asszimiláció /38,39/ és a kloroplasztok fotokémiai aktivitása /44/. A virusos sárgaság elleni védekezés még nincs teljesen megoldva.

Irodalmi adatok szerint virusfertőzött növényeknél, igy a cukorrépánál is, a fehérjetartalom csökkenése mutatható ki /42,45, 52/. Az összfehérjetartalom csökkenése vizsgálataim alapján friss levélnél 2 %, levélplazmánál o,7 % körül van /3.táblázat/.

A cukorrépa plazmafehérjéit eddig csak nagyfeszültség és erősen lugos közeg alkalmazásával tudták papirelektroforézis segitségével szétválasztani /37/. Munkám során viszont papirelektroforézissel eredményesen választottam szét a levélplazma fehérjefrakciót lényegesen enyhébb körülmények /1oo-12o V, pH 8,6-9,o/ között. Elektródként sima platinalemezeket, hordozóként Macherey-Nagel 214. papirt használtam. Pufferoldatnak legalkalmasabbnak bizonyult a Michaelis-féle veronál-puffer, melynek ionerőssége μ= o,1 volt /1o,15,53/. A szétválasztandó plazmát 2o μl-es Sahly-pipettával vittem fel a 26 x 3 cm-es papircsik katód-oldalára. Az elektroforézis ideje 3-6 óra között változott a feszültségtől, pH-tól és a kivánt elmozdulási távolságtól függően.

A 1oo-11o C°-on megszáritott elektroferogrammokat a fehérjefrakciók kimutatására amidofekete 1o B-vel Grassmann és Hannig /13, 14/ eredeti módszere szerint, ezenkivül kétféle módositással /16,35/ festettem. Azokarmin B-vel /51/, bromfenolkékkel /11/, Lichtgrün FS-sel /6,36/, valamint a klinikai diagnosztikában is használatos módszerrel is végeztem fehérjefestést. Rideout és Prichard /36/ módszerén annyit változtattam, hogy az 1 %-os ecetsav helyett 5 %-os triklórecetsavban oldottam fel a festéket /Lichtgrün FS/ és a festék feleslegét is 5 %-os triklórecetsavas mosással távolitottam el.

Az elektroferogrammokon szétválasztott fehérjefrakciók festésére nem mindegyik festési módszer volt alkalmas. Legjobban a következő festékek váltak be: Lichtgrün FS, savanyu fukszin, brómfenolkék, azokarmin B és amidofekete 10 B. Az elektroferogrammokon /3-7. ábra/ jól felismerhetők az anód felé elmozdult albumin erősebben és a felvitel helyén maradt globulin halványabban festődött sávjai. Feltételezem, hogy e két főfrakció között elhelyezkedő fehérjesáv pszeudo- és euglobulinok keveréke. Az egészséges növény albumintartalma 2,1-szer, globulintartalma 1,6-szor nagyobb, mint a fertőzötté. A fertőzött növények elektroferogrammjain egy erősen savanyu fehérjefrakció is jelentkezett. Az elektroforézis körülményei mellett a gyökérplazma fehérjéi nem vándoroltak.

A plazmafehérjék sófrakciónálására az ismert számos módszer közül a káliumfoszfátos eljárást választottam /1,41/. Kémcsövekben lévő 2-2 ml plazmához növekvő mennyiségben adtam káliumfoszfát oldatot. 16 órás inkubálás után a kivált fehérjéket leszürtem és szüredékben meghatároztam a fehérjetartalmat. A felvett oldékonysági görbék /10.ábra/ lényeges különbségeket mutatnak. Fertőzött levél plazmájából gyakorlatilag teljesen hiányzik a globulin, míg az egészséges levél plazmájából közel lineárisan csapódik ki. Az oldékonysági görbe szerint papirelektroforézisnél az átmeneti fehérjefrakció albumin. Glutelintipusu fehérjéket nem sikerült kimutatnom.

Beal és munkatársainak módszere /2/, a trifeniltetrazoliumkloridos reakció nem bizonyult megbizhatónak a virusos sárgaság kimutatására.

A kolloidlabilitási próbák nagy része jellemző különbségeket mutatott a fertőzés hatására bekövetkezett fehérjetartalom csökkenése folytán /11.ábra/. Ki nem elégitő eredményt kaptam a Takata-Ara-reakcióval, a Weltmann-féle reakcióval és a cinkszulfát próbával. A Mallen-féle jódpróbát szántóföldön is jól alkalmazható csepp-reakcióvá dolgoztam ki. A virusos fertőzés a labilitási próbáknál a Westergreen-módszerhez hasonlóan is

kimutatható /12.ábra/. Több általánosan használt fehérjekicsapó reagenssel szintén kimutatható a fertőzöttség.

A kolloidlabilitási és fehérjekicsapási próbák nem specifikusak, kizárólag a fehérjetartalomban mutatkozó különbségeken alapulnak.

A növényi virusosfertőzéseket szerológiai uton is ki lehet mutatni. A cukorrépa virusos sárgaságának szerológiai kimutatására virusos plazmával mint antigénnel lovat immunizáltam. A plazma infuzióját két esetben /összesen 6oo ml/ végeztük. Az első infuzió alkalmával fellépett allergiás sokkot az állat elviselte. Az immunizálás során több alkalommal vettünk vért, végeztem szérum-elektroforézist és precipitációs reakciót /6. táblázat/. A kisérlet 9. és 16. napján a precipitin-reakció negativ volt /17-2o.ábra/. Pozitiv eredményt meglehetősen hosszu lappangási idő után /25. nap/ kaptam /21-22.ábra/. A precipitációs görbék értékelése szerint a 9. és 16. napon a csapadékképzésben jelentősen vettek részt inkomplett antitestek, a 25. napon pedig kizárólag komplett antitestek reagáltak egészséges és virusos antigénnel. A virusos antigén ekkor kb. 2,5-szer nagyobb antigén-antitest-komplex kicsapódást mutatott, mint az egészséges antigén /13.táblázat/. A komplex mennyiségének mérését nefelometriásan végeztem. A kisérlet során öt alkalommal végrehajtott elektroforézis is bizonyitja, hogy az immunsavó globulintartalma, tehát a globulintipusu antitestek mennyisége fokozatosan emelkedett /24.ábra/.

A cukorrépa virusos sárgasága jelentősen csökkenti a levelek fehérjetartalmát, ezen belül elsősorban a globulinfrakció mennyiségét. Ezzel a fertőzés egyik következményét bizonyitottam, de további vizsgálatokra van szükség, hogy a fertőzés elsődleges folyamatait, biokémiai okait és mechanizmusát megismerhessük.

Kisérleti rész.

1. A vizsgálati anyag előkészitése.

1.1. A fehérjetartalmu plazma készitése. A cukorrépalevelekről megnedvesitett vattával távolitottam el a mechanikai szennyeződéseket. A levelekről a levélnyelet és a főeret eltávolitottam és a leveleket lederáltam. A présnedvet 25.I.a. jelzésü selyemszitaszöveten /átlagos lyukméret 7o x 7oμ/ átszürtem és 73oo g gyorsulással lo percig centrifugáltam. Centrifugálás után az oldat tetején levő világoszöld, főleg lipoidokat tartalmazó, vékony réteget finom kapillárissal, vizsugárszivattyu segitségével eltávolitottam. Az igy készitett présnedv más sok alakos elemet /keményitőszemcsék, sejtmagok, mitokondriumok, plasztidák, stb./ tartalmazott.

1.2. Élesen átlátszó, homogén, sárgásbarna szinü plazmát kaptam, ha a lecentrifugált présnedvet EK jelzésü Seitz-szürőn leszürtem. A plazmát néhány órán belül fel kellett használnom, mert összetétele változott /48 óra mulva, 4 C°-on tárolva már csapadék vált ki/.

A leszürt, tiszta plazma pH 6,2-6,7, fajlagos ellenállása 47-69 ohm /o,85-1,35 %-os NaCl oldatával egyenértékü/ volt.

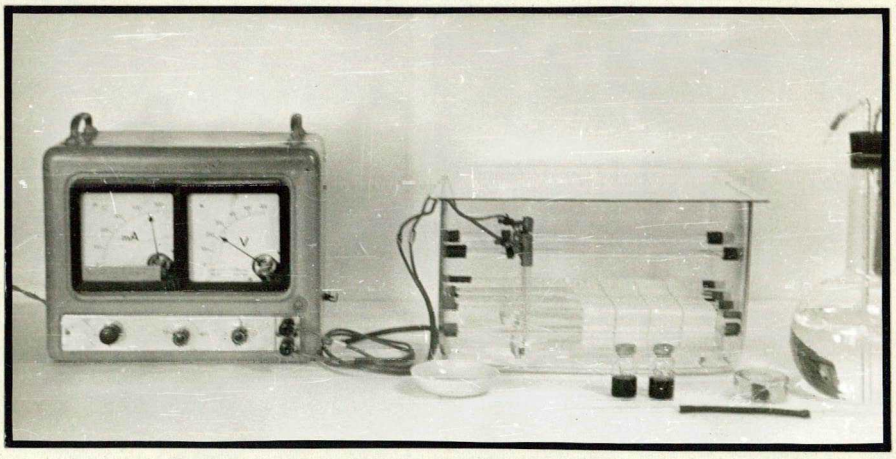
2. Fehérjetartalom meghatározása. A Kjeldahl-módszerrel végzett fehérjemeghatározásokhoz felapritott, friss levelet és az 1.1 pont szerint készitett sejtplazmát használtam. 5o ml-es kvarc Kjeldahl-lombikban o,5 g körüli levelet, illetve 2 ml plazmát roncsoltam 4 ml cc. kénsavval, káliumszulfát-rézszulfát katalizátor jelenlétében. Néhány tized ml hidrogénperoxid hozzáadásával a roncsolás ideje 25-3o percre csökkent. A lombikot csapvizzel lehütöttem, majd lo ml viz hozzáadása után a peroxid elbontására lo percig forraltam. Az ismét lehütött oldatot veszteség nélkül mikro

ammoniadesztilláló készülékbe vittem át. 5 perces desztilláció után a o,1 n kénsavban felfogott ammoniát o,1 n NaOH-dal titráltam meg, Croak-indikátor jelenlétében.

3. Papirelektroforézis.

3.1. Készülék. Az elektroforézishez szükséges egyenirányitót Markham /3o/ vázlata alapján terveztem meg. A készüléket 6oo V-ig 5o voltonként fokozatkapcsolóval, ezen belül potenciométerrel tetszésszerinti feszültségre lehetett beállitani. Maximális terhelhetősége 1o mA volt. Az elektroforézist száraz anódteleppel mint áramforrással, ugyancsak el lehetett végezni. Mindkét áramforrással teljesen egyenértékü elektroferogrammokat kaptam.

Az elektroforéziseket általában 1oo-12o V között, 8-1o mA áramerősséggel végeztem. Ilyen terhelésnél az elektroforéziskamra melegedése /kb. 1 watt/ nem volt mérhető. A kezdetben használt szénelektródok oldódása folytán a puffer és a papir erősen szennyeződött, ezért elektródként sima platinalemezeket használtam. Elektroforéziskamrául 18x2ox3o cm-es üvegkád szolgált; a papircsikokat a kád hosszában elhelyezett, gumicsődarabokkal rögzitett üvegrudakra helyeztem. A futtatási idő 3-6 óra volt.



25.ábra. Elektroforézis-készülék.

3.2. Puffernek legalkalmasabbnak bizonyult a pH 8,6-9,o-es Michaelis-féle veronál-puffer, melynek összetétele /1o,15, 53/:

29,43 g veronál-Na,
19,43 g NaOAc. $3H_2O$,
8o-18o ml o,1 n HCl /a kivánt pH-tól függően/,
3ooo ml-re töltve.

A puffer ionerőssége μ = o,1.

3.3. Papir. Macherey-Nagel 214. A pufferbe meritett 3x26 cm-es papircsikokról a puffer feleslegét szürőpapirok között, enyhe nyomással távolitottam el. Az elektroforéziskamrába egyszerre 4 csik fért el. A kamrába a vizgőzzel telt atmoszféra biztositására - és ezáltal a csikok kiszáradásának megakadályozására - vizzel átitatott szürőpapirt helyeztem. A teljesen összeállitott elektroforéziskamrát az elektroforézis megkezdéséig legalább egy órán át állni hagytam.

3.4. Az anyag felvitele. A vizsgálandó anyagot a katód-oldalra, a csik végétől kb. 8 cm-re vittem fel. A felvitt plazma térfogata minden esetben 2o μl volt. A plazma felvitelére legalkalmasabbnak a 2o μl-es Sahly-pipetta mutatkozott.

Az elektroforézis ideje 3-6 óra között változott a feszültségtől, pH-tól és a kivánt elmozdulási távolságtól függően.

Az elektroforézis befejeztével a kamrából kiemelt, nedves elektroferogrammokat a festés követelményeinek megfelelően, rendszerint előre melegitett száritószekrényben, üveglapon szárítottam.

3.5. Festés.

3.5.1. Amidofekete 1o B. Grassmann és Hannig /13,14/ szerint: 9o ml metilalkohol és 1o ml ecetsav keveréket amidofekete 1o B-vel hidegen telitettem /kb. 1,2 g festék szük-

séges/. A loo C^{o}-on szárított elektroferogrammokat lo percig festettem hidegen ebben az oldatban, majd addig mostam 9:1 összetételü metilalkohol-ecetsav keverékében, amig az alap halványkék nem lett.

3.5.2. Amidofekete lo B Pučar /35/ szerint módositva. A lo5 C^{o}-on szárított elektroferogrammokat 2-3 percig absz. etilalkoholban főztem, majd szárítás nélkül az előző pontban leirt összetételü forró festékoldatban festettem 4 percig. A papircsikokat ezután 5 percig üveglemezen hagytam lehülni és bepárlódni, majd többször váltott 8o C^{o}-os, 5 %-os vizes ecetsavval addig mostam, amig a fehérjementes papirrész el nem szintelenedett.

3.5.3. Amidofekete lo B Peters és Vuysteke /16/ módositásában: 4o ml metilalkohol, 5o ml viz és lo ml ecetsav keverékében oldottam fel o,6 g festéket. A lo5 C^{o}-on szárított elektroferogrammokat szobahőmérsékleten lo percig festettem. A mosást többször váltott, vizfürdőben 65 C^{o}-ra melegitett, 1 %-os vizes ecetsavval végeztem.

3.5.4. Azokarmin B Turba és Enenkel /51/ szerint. A festékoldat összetétele: 5o ml metilalkohol, 4o ml viz és lo ml ecetsav keverékében hidegen telitett azokarmin B. Ebben az oldatban festettem a csikokat lo percig. A festék feleslegét 1 %-os csapvizes ecetsavval végzett mosással távolitottam el.

3.5.5. Brómfenolkék. A festést Durrum /11/ módszere alapján végeztem. $HgCl_2$-dal telitett metilalkoholban oldottam fel o,1 g brómfenolkéket. A papircsikokat szobahőmérsékleten festettem 5 percig. Mosás lo percig áramló csapvizzel, majd 1 % $HgCl_2$-ot tartalmazó metilalkohollal és etilalkohollal, végül tiszta metilalkohollal, amig a papir elszintelenedett.

3.5.6. Ólomacetát. A papirt 2 %-os vizes $Pb/OAc/_2.2H_2O$ oldatában tartottam lo percig, a reagens feleslegét vizes mosással távolitottam el, a mosóviz feleslegét szürőpapirok között préseltem ki. Ezután a még nedves elektroferogrammokat H_2S atmoszférába helyeztem.

Az ólomacetátos kezelést megismételtem azzal a változtatással, hogy a papircsikokat 5 percig forraltam 2 %-os vizes ólomacetát-oldatban. Mosás és kénhidrogénes kezelés mint előbb.

3.5.7. Uranilacetát. o,o5 %-os uranilacetát vizes oldatában tartottam a csikokat lo percig, melyeket ezután kétszer váltott desztillált vizben mostam, majd llo C^{o}-on szárítottam.

3.5.8. Savanyu fukszin. A lo5 C^{o}-on szárított elektroferogrammokat 5o ml metilalkohol, lo ml ecetsav és 4o ml viz keverékében oldott o,2 g savanyu fukszin oldatában lo percig festettem hidegen. A festék feleslegét váltott lo %-os csapvizes ecetsavval oldottam le a papirról, mely csaknem teljesen szintelenre volt mosható a fehérjét nem tartalmazó helyeken.

3.5.9. Lichtgrün FS. A száraz elektroferogrammokat Caspani és Magistretti /6/ módszerével festettem. Festékoldat: looo ml vizben oldott 5o mg Lichtgrün FS és 5o g triklórecetsav. Mosás 5 %-os vizes triklórecetsavval.

3.5.lo. Lichtgrün FS. Rideout és Prichard /36/ eljárását annyiban módositottam, hogy az 1 %-os ecetsav helyett 5 %-os triklórecetsavban oldottam fel 1 %-nyi festéket. Elektroforézis után a papircsikokat lo5 C^{o}-on megszáritottam, majd 5 percre 5 %-os triklórecetsavba meritettem. Az 5 percig tartó festés folyamán a csikokat enyhén mozgattam. A fehérjementes helyekről a festéket 5 %-os vizes triklórecetsavas mosással, a triklórecetsavat csapvizes mosással távolitottam el.

4. Káliumfoszfátos frakcionálás Butler /1/ szerint. Savanyu káliumfoszfátot /KH_2PO_4, Sörensen-féle/ mozsárban elporitottam és lo5 C^{o}-on sulyállandóságig száritottam. looo ml-es mérőlombikba bemértem 4o8,3 g száraz foszfátot. A fosz-

fáthoz kb. 850 ml vizet és 100 ml vizben feloldott 84,2 g KOH-ot adtam. A káliumfoszfátot vizfürdőben való melegítéssel és rázással oldatba vittem, majd szobahőmérsékletre való lehütés után jelig töltöttem. A frakcionáló oldat pH-ja 6,55, molaritása 3,0 volt.

15 folytatólagosan számozott, száraz kémcsőbe mértem le 2-2 ml plazmát. Az 1.kémcsőben levő plazmát fiziológiás konyhasó-oldattal 20 ml-re higitottam és ebből az oldatból határoztam meg az összfehérje-tartalmat.

A többi kémcsövekben levő plazmához növekvő térfogatu foszfátoldatot adtam, fiziológiás konyhasó-oldattal 20 ml összetérfogatra töltöttem /4.táblázat/ és összeráztam.

A kémcsöveket 16 órára ultratermosztáttal szabályozott 25 C°-os vizfürdőbe állitottam és a kémcsövek tartalmát időnként összeráztam. Állás közben - a növekvő foszfátmennyiségtől függően - fehérje csapódott ki a kémcsövekben. Az oldatokat kvantitativ szürőpapiron /Macherey-Nagel 640 d/ szürtem és a szüredékben meghatároztam a fehérjetartalmat. A szedő, illetve mérőoldat koncentrációja 0,02 n volt. Az egyes kémcsövek fehérjetartalmát az 5.táblázat tünteti fel.

5. Kolloidlabilitási reakciók. A reakciók kivitelezésénél kizárólag az 1.1 pont szerint készitett présnedvet használtam.

5.1. Darányi-féle kolloidlabilitási reakció. Reagens: 10 ml 96 %-os etilalkohol és 41 ml 2 %-os NaCl-oldat frissen készitett elegye. 1 ml plazmát és 3,5 ml reagenst ráztam összze kémcsőben. Összerázás után 20 percre 60 C°-os vizfürdőbe állitottam, majd szobahőmérsékleten állni hagytam.

5.2. Viz-próba /Dreyfus/. 0,4 ml szérumot elegyitettem 6 ml vizzel. A fehérjekicsapódást 30 perc mulva figyeltem meg.

5.3. Jód-próba /Mallen/. A reagens készitésére 1 g jódot és 2 g KJ-ot oldottam fel 300 ml vizben. A fehérjék kimutatá-

sára azonos térfogatu levélprésnedvet és reagenst elegyitettem.

A csepp-reakció kivitelezésénál 4o-5o cm^2 felületü levelet préseltem ki kézi répaprés segitségével. 1 csepp présnedvet higitottam mélyitett tárgylemezen 2 csepp desztillált vizzel, ezután 1 csepp Lugol oldatot adtam hozzá. A cseppeket a tárgylemez mozgatásával vagy tiszta üvegbottal kevertem össze.

5.4. Kanngiesser-féle reakció /23/. Egészséges és fertőzött levelek présnedveit elegyitettem azonos térfogatu 2o %-os vizes NaCl-oldattal.

5.5 Hayem-próba. 5-5 ml présnedvet Hayem-oldattal titráltam. A Hayem-oldat összetétele:

o,25 g merkuriklorid,
1,oo g nátriumklorid és
2,5o g nátriumszulfát
loo ml-re töltve.

Meghatározandó az a térfogat, melynek hozzáadása után rázásnál még oldódó kicsapódás kezdődik és az a térfogat, melynél irreverzibilis kicsapódás lép fel.

5.6. Takata-Ara reakció.

Reagensek:

a. lo %-os Na_2CO_3 /vizmentes/ oldat,
b. o,5 %-os merkuriklorid-oldat,
c. o,o2 %-os vizes bázikus fukszin.

Az utóbbi két oldatot közvetlenül használat előtt 1:1 arányban elegyitettem.

A présnedvből 9 kémcsőben 2 - 512-szeres higitást készitettem fiziológiás konyhasó-oldattal: minden kémcsőbe 4 ml nátriumklorid-oldatot, majd az első kémcsőbe 4 ml-présnedvet mértem. Összerázás után az első kémcsőből 4 ml-t vittem át a másodikba és igy tovább. Az utolsó kémcsőből kivett 4 ml oldatot eldob-

tam. Ezután minden kémcsőhöz 1 ml 1o %-os nátriumkarbonát-oldatot és 1,2 ml Takata-reagenst adtam. A ledugaszolt kémcsöveket összerázás után 24 órán át hagytam állni szobahőmérsékleten.

5.7. Weltmann-féle reakció. 1o számozott kémcsőbe mértem be egészséges és virusos sárgasággal fertőzött levél plazmájának azonos térfogatait és különböző koncentrációju kálciumklorid-oldatot az alábbi táblázat szerint:

14.táblázat.

Kémcsövek sorszáma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o
1 %-os $CaCl_2$ ml	1o	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Deszt. viz ml	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Plazma	minden kémcsőben o,2 ml									
$CaCl_2$-koncentráció csövenként %-ban	1,o	o,9	o,8	o,7	o,6	o,5	o,4	o,3	o,2	o,1

A kémcsöveket összerázás után 15 percre forró vizfürdőbe állitottam.

5.8. Gerlóczy-féle reakció. A présnedvet azonos térfogatu /o,145 mólos/ káliumszulfát, káliumklorid, káliumbromid, káliumnitrát, káliumjodid és káliumrodanid-oldattal ráztam összsze. A sóoldatok %-os koncentrációja:

2,54 %-os	K_2SO_4 oldat	1,47 %-os	KNO_3 oldat
1,o8 "	KCl "	2,42 "	KJ "
1,73 "	KBr "	1,41 "	KSCN "

A keverékeket tartalmazó kémcsöveket 5o C^o-os vizfürdőbe ál-

litottam, majd a vízfürdő hőmérsékletét lassan tovább emeltem 6o C^0-ig.

5.2. Kürten-féle formalin-reakció. 4o %-os formaldehidet fenolftalein jelenlétében 2o %-os vizes nátriumkarbonát-oldattal semlegesítettem. A semlegesített formaldehidből o,75 ml-t adtam cseppenként 2 ml préselvhez.

5.3. Cinkszulfát-próba. /Kunkel/. o,1 ml plazmát elegyítettem 6 ml reagenssel. A fellépő zavarosodásokat 3o perc múlva hasonlítottam össze. A reagens összetétele az alábbi volt:

24 mg $ZnSO_4.7H_2O$,
28o mg verenál,
21o mg verenál-Na
looo ml vízben oldva, pH 7,5.

5.11. Fehérjekicsapási reakciók. 2-2 ml egészséges és virusos sárgasággal fertőzött cukorrépalevél préselvét ráztam össze az alábbi reagensek le-lo ml-ével:

96 %-os etilalkohol,
2o " triklórecetsav,
1o " foszforwolframsav,
1o " ólomnitrát,
telített ammoniumszulfát.

6.1. Virusos préselv előkészítése infúzióhoz. A Seitz-en szűrt virusos préselv pH-ja 6,2, fajlagos ellenállása ϱ = 65 ohm volt. A lószérumával azonos pH elérésére a levélplazmához szilárd $NaHCO_3$-ot adtam és a sókoncentráció csökkentésére az oldatot azonos térfogatu 5 %-os szőlőcukor oldattal higítottam.

6.2. Precipitációs próba. Az antitestként szolgáló centrifugált lószérumot fiziológiás sóoldattal higítottam 1:1 - 1:64 koncentrációig, a Seitz-en szűrt egészséges és virusos levélből származó préselvket /antigén/ 1:1 - 1:256-ig. Az antigén higítási sorozat minden egyes tagjának 2-2 ml-ét az anti-

test higitási sorozat minden egyes tagjának 2-2 ml-ével elegyítettem. Összerázás után az antigén-antitest keveréket 37 C^{o}-os vízfürdőben inkubáltam.

Az inkubálás ideje 3 óra volt. Ezután a kémcsövekben lévő keveréket jeges vízzel lo C^{o}-ra hütöttem és a kivált csapadék mennyiségét Pulfrich-fotométerrel nefelometriásan mértem λ = 53oo Å-nél.

Irodalom.

1. Bálint,P. - Kegedüs,A.: Klinikai laboratóriumi diagnosztika. 2.kiadás. Müvelt Nép. Bp. 1955.

2. Beal,J.M. - W.H.Preston - J.W.Mitchell: Plant Disease Reporter 39, 558-6o /1955/.

3. Bercks,R. - H.Burghardt: Phytopath.Z. 32, 2o7-22 /1958/.

4. Boyd,W.C.: Fundamentals of immunology. Interscience.London. 1956.

5. Calvin,M.: J.chem.Soc. 1895-1915 /1956/.

6. Caspani,R. - M.Magistretti: Plasma 2, 33-49 /1954/.

7. Chibnall,A.C.: J.Biol. Chem. 61, 3o3 /1924/.

8. Chick,H. - C.J.Martin: Biochem. J. 7, 38o-98 /1913/.

9. Cushing,J.E. - D.H.Campbell: Principles of immunology. Mc.Graw Hill. New York. 1957.

1o. Dittmer,A.: Papirelektrophorese. 2.Aufl. Fischer. Jena. 1961.

11. Durrum,E.L.: J.Am.Chem. Soc. 72, 2943-8 /195o/.

12. Fuchs,W.H. - U.Beiss: Naturwiss. 41, 5o6 /1954/

13. Grassmann,W. - K.Hannig: Naturwiss. 37, 496-7 /195o/.

14. Grassmann,W. - K.Hannig: Z.physiol. Chem. 29o, 1-27 /1952/.

15. Grüne,A.: Papierchromatographie. Arbeitsmethodik. Schleicher-Schüll. Dassel. 1955.

16. Grüne,A.: Papierchromatographie und Papierelektrophorese. Chimia 11, 173-2o3 és 213-256 /1957/.

17. Hardy,W.B.: J. Physiology 33, 251-337 /19o5/.

18. Hofmeister,F.: Z. physiol. Chem. 14, 165-72 /189o/.

19. Hollander,A.: Radiation biology. McGraw Hill. New York. 1956.

2o. Howe,P.E.: J.Biol. Chem. 49, 93-1o7 /1921/.

21. Jermoljev,E.: Sbornik CSAZV Rostlinna vyroba,Praha,4,1127-9 /1958/.

22. Jermoljev,E.: Vesztn. szelszk. nauki 2, 135-9 /1957/.

23. Kanngiesser,W.: Naturwiss. 41, 3o7 /1954/.

24. Kanngiesser,W.: Naturwiss. 42, 631 /1955/.

25. Kanngieseer,W.: Naturwiss. 43, 47o-1 /1956/.

26. Kleczkowski,A. - M.A.Watson: Ann. Appl. Biol. 31, 116-2o /1944/.

27. Kovács,A.: Növénytermelés 2, 251-61 /1953/.

28. Kovács,A.: Kandidátusi értekezés. 1954.

29. Láng,S.: Vegyi és mikroszkópos vizsgálatok. Novák. Bp. 1941.

3o. Markham,R.: Modern methods of plant analysis 4, 246-3o4 /1955/.

31. Matthews,R.E.F.: Plant virus serology. Cambridge University Press. 1957.

32. Mellanby,J.: J. Physiol. 33, 338-73 /19o5/.

33. Mundry,K.W. - F.Schneider: Z.f.Naturforsch. 11b, 573-8 /1956/.

34. Nezgovorova,L.A.: Dokl. A.N. SzSzSzR. 79, 537-4o /1951/. Ref.: C.A. 45, 1o315a /1951/.

35. Pučar,Z.: Z. physiol. Chem. 296, 62-6 /1954/.

36. Rideout,L.A. - R.W.Prichard: Science 121, 374 /1955/.

37. Schneider,G. - G.Spermann: Naturwiss. 42, 391 /1955/.

38. Schultz,G.: Zucker 11, 374-7 /1958/.

39. Schultz,G.: Z.f. Naturforsch. 13b, 469-71 /1958/.

4o. Slogteren,E. van: Lab. Bloembollen-onderzoek. Lisse.No.76.1944.

41. Somfalvy,E. - S.Ausch,K.: Növénynemesitési és Növénytern. Kut.Int.Közl. Sopronhorpács.II.köt.83-9o /1962/.

42. Sommer,E.: Z.f. Zuckerind. 7, 387-93 /1957/.

43. Sörensen,S.P.L.: C.r. Lab. Carlsberg 18, Nr.5, 1-124 /193o/.

44. Spikes,J.D. - M.Stout: Science 122, 375-6 /1955/.

45. Steudel,W. - A.Heiling: Mitt.Biol. Zentralanstalt f. Land- und Forstwirtschaft, Heft 79, 1-132 /1954/.

46. Sziszakjan,N.M.: Die fermentative Aktivität der protoplasmatischen Strukturen. Akademie-Verlag.Berlin.1954.

47. Sziszakjan,N.M.: Vopr. bot. 224-55 /1954/.

48. Sziszakjan,N.M.: On biochemical synthesis in chloroplasts. Moscow. 1957.

49. Sziszakjan,N.M.- Sz.Sz.Melik-Szarkiszjan: Biokimija 21, 329-39 /1956/.

5o. Trzebinski,J.: Sbornik cukrovarnicko-reparské konference v Praze /Praha/ 1, 536-47 /1957/.

51. Turba,F. - H.J.Enenkel: Naturwiss. 37, 93 /195o/.

52. Ubrizsy,G.: Növénykórtan. Akadémiai Kiadó. Bp. 1952.

53. Wunderly, Ch.: Die Papierelektrophorese. Methoden und Ergebnisse. Chimia 7, 145-6o /1954/.